

私立中山醫學大學生物化學研究所
Institute of Biochemistry College of Medicine
Chung Shan Medical University

碩士論文
Master Thesis

血管昇壓素活化類胰島素生長因子-II 接受體之訊息傳遞途徑在血管
昇壓素誘導心肌細胞凋亡所扮演之角色

Roles of Insulin-like growth factor-II receptor signaling
pathway in cardiomyocytes apoptosis induced by Angiotensin II

指導教授：黃志揚 博士 (Chih-Yang Huang, Ph. D.)

研究生：朱俊憲 (Chun-Hsien Chu)

中華民國九十二年六月

本論文為中山醫學大學授予學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

陽明大學教授

王錫崗

王錫崗

成功大學教授

李碧雪

李碧雪

中山醫學大學毒理學研究所副教授

柯俊良

柯俊良

中山醫學大學生物化學研究所副教授

劉哲育

劉哲育

中山醫學大學生物化學研究所副教授

黃志揚

(論文指導教授)

黃志揚

致謝

承蒙恩師 黃志揚 博士兩年來的悉心的教導，使本論文得以順利完成，在此致上由衷的敬意與感謝。此外感謝國立陽明大學 王錫崗 教授、國立成功大學 李碧雪 教授及中山醫學大學 劉哲育 副教授、柯俊良 副教授在論文的審閱及斧正，讓本論文得以順利完成。

在這兩年的研究生活中，受過了許多人的幫助，僅以此論文獻給關心我及鼓勵我的師長、朋友及 803 實驗室的共戰夥伴。

目錄

摘 要.....	01
英文摘要.....	03
序言.....	04
動機.....	41
材料與方法.....	43
結果.....	53
討論.....	71
參考文獻.....	75

摘 要

心臟疾病，如：擴張性心肌症和心衰竭等常見心肌細胞的凋亡產生，而血管昇壓素（Angiotensin II；Ang II）為造成心血管相關疾病，如：高血壓、心肌肥大和心肌凋亡的主要危險因素。已知類胰島素生長因子-I（IGF-I）及類胰島素生長因子-II（IGF-II）在胎兒心肌細胞扮演重要角色，文獻曾報導 Ang II 可作用在骨骼肌細胞中，並誘導 IGF-I 的自體分泌，來協同調節 Ang II 對於肌肉細胞的刺激反應。然而，在心肌細胞中，Ang II 是否可直接影響 IGF-I 和 IGF-II 的表現和作用，以及 IGF-II 在心肌細胞中扮演的角色則仍不清楚。在本實驗中，再度確認 IGF-II 必須在 IGF-I receptor 阻抗的情況下，經由 IGF-II receptor 活化去磷酸根酶（Calcineurin），而造成心肌細胞的凋亡，並首度探討了 Ang II 導致心肌細胞凋亡的過程中，IGF-II 扮演的角色以及 Ang II 可能調節 IGF-II 接受體（IGF-II receptor）活化的訊息傳遞路徑。我們分別在 *in vitro* 實驗中採用了 DNA 斷裂法、RT-PCR 及 Western blotting 的技術及並同時以 *In vivo* 腹動脈結紮誘導高 Ang II 的大白鼠模型，證實了 IGF-II 和 IGF-II receptor 確實參與了 Ang II 誘導心肌細胞凋亡的作用；在 *in vitro* 實驗中，並進一步發現 Ang II 是分別透過 MEK 及 JNK 路徑的活化來誘發 IGF-II 及 IGF-II receptor 的基因表現，進而影響鈣離子及其下游之 Calcineurin 而導致心肌細胞凋

亡；同時在腹動脈結紮 0、1、2、3、5、7、10、20 天誘導高 Ang II 的動物模型中，發現左心室中 IGF-II 及 IGF-II receptor 含量隨著結紮天數增加逐漸上升，並伴隨著凋亡蛋白 Caspase 9 的增加。以上的實驗證明，高濃度的 Ang II 乃分別經由 ERK 及 JNK 促進 IGF-II 及 IGF-II receptor 的基因表現，進而活化 Calcineurin 並誘導心肌細胞的凋亡。

Abstract

Excessive apoptosis of cardiomyocytes was suggested to be a possible mechanism in the pathogenesis of heart disease, such as dilated cardiomyopathy and heart failure. Angiotensin II (AngII), which induce apoptosis of adult ventricular myocytes *in vitro*, may be involved not only in the etiology of hypertension but also in the pathophysiology of cardiovascular disease in human. Furthermore, it is known that IGF-I and IGF-II play important roles in the development of fetal cardiomyocytes. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is a autocrine mediator of growth response of Ang-II in skeletal muscle cell *in vitro*, but whether AngII also stimulates gene expression of cardiac insulin-like growth factor II in cardiomyocytes, and how this growth factor exerts its effect is unknown.

In the present study, it was reconfirmed that the inactivation of IGF-I receptor by antibodies is necessary for IGF-II to induce apoptosis of cardiomyocytes through the activation of calcineurin by IGF-II receptor. Moreover, it was also identified that AngII-induced apoptosis may be mediated by IGF-II and AngII may regulate the activity of IGFIR-mediated signaling pathways. The results showed that in the *in vitro* system, AngII can activate ERK and JNK to induce the gene expressions of IGF-II and IGF-II receptor, both of which further stimulate cardiomyocytes apoptosis by Ca^{2+} influx and activating the calcineurin pathways. Similarly, in the AngII-inducing model of the 1 to 20-day abdominal aorta coarctation in Sprague-Dawley (SD) rats, increasing levels of IGF-II as well as its receptor and the pro-apoptotic protein caspase 9 in left ventricular were also found.

This is the first demonstration indicating that ERK and JNK mediated the AngII-induced expression of IGF-II and IGF-II receptor which further activate calcineurin signaling, contributing to cardiomyocyte apoptosis.

序言

一、Angiotensin II and Heart

在傳統的路徑上 angiotensin II (Ang II) 主要是由 Renin-angiotensin system (RAS) 所產生，並且被瞭解其對於全身性及局部性血壓的升高有著顯著的影響，並會造成 Renal tubules 會保留 Sodium 和 Water，及刺激 Adrenal gland 釋放 Aldosterone (1)。而在 Pharmacological 和臨床的人體實驗中，發現 Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors 和 Ang II receptor antagonists，證實 Ang II 在於 Hypertension 的形成上，以及在病理上的 Cardiac hypertrophy，Remodeling，Heart failure，Vascular thickening，Atherosclerosis and Glomerulosclerosis 的發生扮演著重要調控者的角色 (1)。

然而在許多 *In vivo* 和 *In vitro* 實驗中，發現 Ang II 能直接造成在 Cardiovascular cell growth，調節 Various bioactive substances 基因的表達，這些 Bioactive substances 包括了：Vasoactive hormones，Growth factors，Extracellular matrix (ECM) components，Cytokines，及能活化 Multiple intracellular signaling cascades，包括了：Mitogen-activated protein (MAP) kinases cascades，Tyrosine kinases，Various transcription factors。在許多文獻中指出，Ang II 不需經由對血壓的影響，而能直接造成 Cardiovascular disease (2)。

Renin-angiotensin system

Renin-angiotensin system 包括了：Angiotensinogen、Renin、Angiotensin I、Angiotensin converting enzyme(ACE)、Ang II。在傳統路徑上，Angiotensin 的生合成是在 Blood stream 中進行，Angiotensinogen 於肝臟中生成後，會釋放到血液，而 Renin 可將 Angiotensinogen 切割形成十個氨基酸的 Angiotensin I，Renin 主要由 Kidney 的 Juxtaglomerular cells 所分泌；而 Angiotensin I 並無生理活性，須經由 Lung 所分泌的 Angiotensin converting enzyme(ACE) 催化成 8 個氨基酸的 Ang II (1)，而 Ang II 具有生活性能直接對器官造成影響，這些器官包括了：Artery、Adrenal zona glomerulosa、Kidney、Brain、Sympathetic nervous system、Heart (3)。

而在非傳統路徑上，Ang II 被發現能由器官形局部性的合成 (4)，這些器官包括了：Brain、Pituitary、Heart、Kidney、Gonads、Pancreas；在這些器官中 Ang II 能經由 Autocrine 和 Paracrine 對細胞造成影響。而在心臟組織中，當心臟在接受外力刺激時，心肌細胞會行 Autocrine 分泌出 Ang II，而 Ang II 會進一步造成 Myocardial necrosis、Fibrosis、Hypertrophy 的發生 (5、6)。

(二)Angiotensin II receptors

在 Cardiac tissue 中，Ang II 主要經由活化 Ang II receptors (Ang II R)對心臟造成影響，而 Ang II R 主要可分為 AT₁ 和 AT₂ 二個不同 isoform(7、8)；而 AT₁ 又可分為 AT_{1A} 和 AT_{1B} 兩類(9)，在胺基酸序列上有著 94%的相似度。AT_{1A} receptors 和 AT_{1B} receptors 兩者的功能有些許的不同，AT_{1A} receptors 在 Cardiomyocytes 中，主要調節血壓和為一有力的 Growth stimulators，而 AT_{1B} 則控制著 Vascular tone (10)。

Ang II receptors 是一個 7-transmembrane domain 的 G protein-coupled receptor (GPCR) (11)，Ang II receptors 缺乏 Intrinsic tyrosine kinase activity，當 Ang II 結合於接受體時，接受體會與細胞質內的許多蛋白進行偶合作用，其中包括了 Heterotrimeric G protein (12)；而 Ang II receptors 主要利用其第二個和第三個的 Cytosolic loops 和 The proximal segment of the carboxy-terminal domain 與 Heterotrimeric G protein 結合，進而傳遞細胞內的訊息(13,14)。在 Rat 中，AT_{1A}，AT_{1B} and AT₂ receptors 的基因分別位於 17、2 and X 的染色體上(13)。而在心臟中，AT₁ receptor gene 的表達在 Fetal 和 Newborn life 時期並無差異，但 AT₂ receptor gene 在 Fetal development 時期有著高度的表達，在 After birth 後便迅速的下降(15)。顯示 AT₂ receptors 的功能可能與 Fetal development 和 Organ morphogenesis 有關(16)。而在先天性高血壓大白鼠 Spontaneously hypertensive rats (SHR)中，發現

AT_{1A} 和 AT_{1B} receptors 在左心室中過度表現，顯示此類的動物中，大量表達由 AT₁ receptor 所活化的訊息路徑，且經由 AT₁ receptors antagonist 在臨床上常用來治療高血壓等心臟相關疾病得知，AT₁ receptors 被認為是 Ang II 造成心臟發生病理現象（如：Hypertension，Hypertrophy）的主要路徑(17)。

另一方面 Ang II 也能經由 AT_{1A}、AT_{1B} receptors 形成一 Intracellular vesicles 進而轉移至細胞質中(18)，而此一 Ang II-AT₁ receptors complex 的半衰期小於 2 min，且發現在細胞內的 Sarcolemma，T tubules and Nuclei 都存在著 AT₁ receptor (19)，而 Ang II 亦被證實能直接與 DNA 結合主要是透過與 Chromatin 內的高親合性接受體（AT₁ receptor）作用，進而改變 Chromatin conformational (20)，調節基因的表達，但此作用不存在於 AT₂ receptor 中，顯示 Ang II 可能有著另外的方式對細胞造成影響。

而 AT₁ receptors 在經由 Ang II 刺激下，被證實能活化 Phospholipase C 進而造成 Ca²⁺ 由 Intracellular depots 釋放出來；也能造成 Tyrosine kinase 和 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 訊息傳遞路徑被活化(21、22)。但活化的 AT₂ receptors 卻能阻斷經由 AT₁ receptors 刺激下所造成的 Mitogenic 和 Hypertrophic response 的現象(23)，主要是經由 Kinin/NO/cGMP system 和 Protein tyrosine

phosphatases and Serine/threonine phosphatase 等路徑來抑制 AT_1 receptors 的功能(24)。但相反的也有文獻指出，在 Dilated cardiomyopathy and Ischemic heart disease 病人的心臟中，造成在 Perivascular 和 Endocardial infarcted areas 有著 Collagen 堆積和 Fibrosis 的現象，而這些區域內有著大量表現的 AT_2 receptors (25)，且在患有 Coronary disease 病人的 Right atrial 中， AT_2 過度表現於 Fibrous tissue(26)，顯示 AT_2 receptors 在心臟中所扮演角色的爭議性。

而在初代培養的初生大鼠心肌細胞 (Cultured neonatal rat ventricular myocyte) 中，Ang II 會透過 AT_1 receptors，及活化 PKC 所造成心肌細胞凋亡 (27)；而抑癌基因 p53 亦會使得 Angiotensinogen 表現上升，使得細胞分泌 Ang II，透過 AT_1 receptors 造成 Apoptosis (27)；且在 AT_{1A} receptors knockout mice 中，處理 Myocardial infarction 發現降低了 Left ventricular remodeling 和較高的存活率(29)；而在其他細胞株方面也有人指出 AT_2 receptors 與 cell apoptosis 有關(30,28)；在 AT_2 receptors knockout mice 中，發現有著較高的血壓 (31)，而在 AT_2 receptors 持續表達下，會減弱了由 AT_1 receptors 活化所造成的 Pressor and Chronotropic effects (32)；並發現 AT_1 receptor gene (1166 A/C) 和 AT_2 receptor gene (1675 A/G) 對於左心室肥大的表現型上，有著 Polymorphism 的現象 (33,34)。

(三) Molecular and cellular action of Angiotensin II in Heart

(1) Angiotensin II 在各種實驗模式上的探討

(A) Cultured cardiac myocyte

在研究心肌細胞肥大的分子機制上，大多使用初代培養的 Neonatal rat cardiac myocytes 或 Adult myocytes，此兩種心肌細胞均表現 AT₁ 和 AT₂ receptors，而 Ang II 主要是透過 AT₁ receptors 影響心肌細胞。在 Neonatal cardiac myocyte (35)和 Adult myocytes (36)中，Ang II 均能刺激心肌細胞產生 Hypertrophy 的現象。在 Neonatal cardiac myocytes 中，Ang II 能造成 Gene reprogramming。而 Gene reprogramming 為 Ang II 經由 AT₁ receptors 造成 Fetal phenotype gene 和 Immediate-early genes 的表達 (37)，而 Fetal phenotype gene 包括了：*β-MHC*、*skeletal α-actin* 和 *atrial natriuretic factor(ANF)*；Immediate-early genes 包括了：*c-fos*、*c-jun*、*jun B*、*egr-1* 和 *c-myc* (38)，而 Immediate-early gene 的表達對於 Ang II 所造成心肌細胞的肥大的現象是否是必須，仍然有些爭議。

在 Neonatal rat cardiac myocytes 中，Ang II 能透過 AT₁ receptors 活化細胞內多種 Signaling cascades，而由於 AT₁ receptors 不具有 Intrinsic tyrosine kinase activity，但 AT₁ receptors 能與

Heterotrimeric G protein (Gαq) 形成偶合作用，進而展開下游的訊息傳遞路徑。當在 Ang II 的刺激下能透過 AT₁ receptors 與 Gαq 的偶合作用，進而活化 Phospholipase C (PLC-β)，活化的 PLC-β 能催化 Inositol triphosphate 和 Diacylglycerol 的產生，並造成 Intracellular stores 釋放 Ca²⁺，活化 Protein kinase C (PKC)(38); 及 Tyrosine kinase、Extracellular signal-regulated kinase (ERKs)、C-Jun amino-terminal kinase (JNKs)、70-Kda ribosomal S6 Kinase (p70S6K)、90-Kda ribosomal S6 Kinase (p90RSK)、p21 ras、Phospholipase A2 and Phospholipase D 和增加 Phosphatidic acid 和 Arachidonic acid (35)，而另外也有一些 Tyrosine kinase 的活化並非是透過 Gαq 與 AT₁ receptors 的偶合作用所造成，例如：Janus kinase 2、Tyk2、Signal transducer and activator of transcription (STAT) and STAT2 (39) 和 Rho A，而活化的 Rho A 能造成 sarcomeric actin organization and ANF 的表達(40)。

雖然 Ang II 在 Neonatal rat cardiac myocyte 中能活化多種的 Signaling cascades，但並非每個訊息傳遞路徑均與 Ang II 造成 Pathological cardiac hypertrophy 有關。在 Cultured cardiac myocyte 中，Ang II 被證實能透過活化 p70S6 Kinase (41) 和增加 Reactive oxygen intermediates (42) 和產生 Endothelin-1 造成 Pathological cardiac hypertrophy (43) 的發生。

雖然 Neonatal cardiac myocytes 和 Adult cardiac myocytes 兩者都是屬於 *in vitro* 的實驗模式，但在 Ang II 造成 Cardiac hypertrophy 的路徑探討上，有著些差異存在，如：在 Adult cardiac myocyte 中，在 Ang II 刺激下，所造成蛋白質合成上升中，並未伴隨者增強 *c-fos* 和 *c-jun* 基因表達 (44)。

(B) Cultured cardiac fibroblast

在心臟的組成中除了 Cardiac myocyte 之外，還存在著 Nonmyocyte cells，大部份即為 Cardiac fibroblast。Cardiac fibroblast 不像 Cardiac myocyte，其具有 Proliferate 的能力，且能分泌 ECM protein (collagen、fibronectin) (45)，為 Cardiac fibrosis 發生的主因。在 Cardiac fibroblasts 中只存在著 AT₁ receptors (46)，而 Ang II 能透過 AT₁ receptors 來造成 Cardiac fibroblast proliferation (47)，而同樣的情形也發生在 Adult cardiac fibroblast。

而在 Neonatal cardiac fibroblasts，Ang II 能透過 AT₁ receptors 造成 *c-fos*、*c-jun*、*jun B*、*Egr-1*、*c-myc* 的 mRNA 表現上升 (37)，亦會促使 Collagen Type I 的分泌(46)，而在 Ang II 造成 Cardiac fibroblast 的 Proliferation 中，與 β_3 integrin 的 Osteopontin engagement 有關(48)。

在 Cardiac fibroblast 中，AT₁ receptors 是與 Gai protein

行偶合作用，不同於 Cardiac myocytes 中的 AT_1 receptors 與 G α_q protein 行偶合作用，所以在 Ang II 刺激下在 Cardiac fibroblast 造成的訊息機制與 Cardiac myocyte 是不同的(49)。而 Ang II 能透過 G α_i protein 活化 ERK 造成 Cardiac fibroblast 的 DNA 合成上昇(49)，並能活化 Focal adhesion kinase、Shc。但 Ang II 如何造成 Cardiac fibroblast 分泌 ECM 則尚未清楚。

(C) Effects of in vivo angiotensio II isofusion on heart.

在上述兩個章節中，分別介紹了在 in vitro 的實驗模式下，探討 Ang II 對於 Cardiac myocytes 和 Cardiac fibroblast 所造成的影響，而在本章節中將在 in vivo 的實驗模式下，直接瞭解 Ang II 在活體中如何對心臟造成傷害。在大白鼠中，使用 Ang II infusion 方式，發現此一大白鼠有著心室肥大的現象，而此一現象並非由 Ang II 經影響血壓造成，而是透過 AT_1 receptors 活化下游的訊息傳遞路徑造成的。且 Ang II 也會造成 Myocyte necrosis、Myocytolysis 和 Cardiac fibroblast proliferation 進而使得心臟產生 Scar formation(50)。而在大白鼠的肥大的左心室中，發現增加了 Skeletal α -actin、 β -MHC、ANF、fibronectin、TGF- β 1、Type I collagen 和 Type III collagen 基因的表現(51)。

在經整理後，可以進一步的發現在 *In vivo* 的情況下，

Ang II 透過 AT_1 receptors 造成心肌細胞產生肥大的現象(DNA 合成不變, Protein 合成上升), 並造成 Gene reprogramming (*skeletal α -actin*、*ANF*、 *β -MHC*)及 Necrosis; 而在 Cardiac fibroblast 中, Ang II 亦透過 AT_1 receptors 造成 Proliferation (DNA 合成上升, Protein 合成上升)及 Gene upregulation (*TGF- β 1*、*collagen type I*、*collagen type III*、*fibronectin* 表現上升), 顯示 Ang II 對於 Pathological cardiac hypertrophy 的形成, 確實扮演一個重要的角色。

而在 in vivo 的情況之下, Ang II 主要是透過 MAP kinase 中的 JNK 和 ERK 此兩條路徑, 造成 Myocyte hypertrophy、Gene reprogramming 和 Fibroblast proliferation (52,53,54), 而在這兩條路徑中又以 JNK 被 Ang II 活化能力較 ERK 強, 而活化的 JNK 會進一步活化 Activator protein-1 (AP-1; composed of c-Fos and c-Jun protein), 而 AP-1 protein 為一 Transcription factor, 能結合在 AP-1 consensus sequence 上, 而 AP-1 consensus sequence 為基因位址上的 Promoter region, 經 AP-1 protein 結合後會造成基因的表達, 而有趣的是 *skeletal α -actin*、*ANF* (55,52)和 *cardiac fibrosis-associated gene* (56), 如: TGF- β 1 和 collagen type I, 均發現有 AP-1 consensus sequence。而 AP-1 的活性已被證實, 能影響 *skeletal α -actin*(57)、*TGF- β* (58)的 Promoter activity; 另外, 在 1998 年時, 被證實 Ang II 能促使 Intracellular calcium

的濃度升高，此時 Calcium 會與 Calmodulin 結合，進而活化 Calcineurin，而活化的 Calcineurin 能將在 Cytoplasm 的 NFAT transcription factor family 給去磷酸化，造成 NFAT 移入細胞核內，開啟肥大基因的表現，顯示 Ang II 能經由 Calcineurin-NFAT signaling pathway 造成 Cardiac hypertrophy (59)。

另一方面在 *in vivo* 的模式下，Ang II 能經由 AT₁ receptors 造成 Cardiac sympathetic nerve terminals 釋放出 Norepinephrine (60) 和 Catecholamine (61)，而 Norepinephrine 和 Catecholamine 會造成 Cardiac myocyte necrosis 和產生 Cardiac damage 的現象，顯示由 Ang II 所活化的 Cardiac sympathetic neurons 亦參與在 Ang II 所造成 Pathological cardiac hypertrophy 中。

(2) Mechanical stress and Angiotensin II in cardiac myocyte

External load 會改變 Cardiac myocyte 的 Muscle mass 和 Phenotype，產生所謂的 Mechanical stretch 的現象 (62)，即 Cardiac hypertrophy。而當心肌細胞受到 Mechanical stress 時，會經由 Mechanosensing mechanisms (63) 和調節 Cardiac renin-angiotensin system (64,65)，來造成 Mechanical stretch。Mechanosensing mechanisms 主要包括了影響 Ion channels 和 Cytoskeleton protein，Extracellular

matrix protein 和與其相連接的蛋白 (66)，這些 Mechanosensitive molecule，大多位於 Plasma membrane 能直接接收 Mechanical stress 進而改變細胞的型態。

另外，就 Mechanical stress 活化的 Multiple signal transduction pathways (67) 與許多 Growth factor 造成心肌細胞肥大所活化的路徑相似。而心肌細胞被證實經 Mechanical stress 刺激下，會造成 Growth factor 的 Autocrine 或 Paracrine，其中包括了：Angiotensio II、Endothelin-1、Basic FGF 的分泌 (68)，而這生長因數所誘發的機制，被認為在經 Stretch-induced organ hypertrophy 的病理機制中，扮演重要的角色 (69)。而其中便以 Mechanical stress 下調整 Cardiac renin-angiotensis system (64)，促使 Ang II 快速的分泌，被認為在 Mechanical stress 所造成的心肌的肥大中，為主要的調控者 (70)。而在 Mechanical stress 下，快速分泌的 Ang II 能活化 Second messengers，進而開啟 Immediate-early gene、Fetal gene 和誘導其他生長因數基因的表現 (71)，協同著影響 Stretch-induced organ hypertrophy。而 Second messengers 包括了：Tyrosine kinase、MAPK kinase、Ribosomal S6 kinase、p21 ras、IP3 (PI-phospholipase C)、Ca²⁺、Diacylglycerol、protein kinase C、Phospholipase D 和 Arachidonic acid release。Immediate-early gene 包括了：*c-fos*、*c-myc*、*egr-1*；fetal gene

包括了：*skeletal α actin*、*ANF*、 *β -MHC*；Growth factor genes 包括了：*TGF β* 、*PDGF*、*Basic FGF*、*Endothelin-1* 和 *Insulin-like growth factor*。顯示在經 Mechanical stress 刺激下，Ang II 能開啟心肌細胞內多樣的訊息路徑，一同調節 Mechanical stretch。且在施行頸動脈結紮手術的大白鼠中，ACE inhibitors 和 AngII type I receptor antagonists 阻斷了經由 Pressure overload 所造成的左心室肥大，顯示 Load-induced hypertrophy 中，Ang II 為一重要的調節者。

二、Insulin like growth factors

Insulin-like growth factors I and II 被發現在 1960 年代，且已被證實 IGFs 能調節 Growth、Development、Cell survival 和 Tissue differentiation 的發生(72,73)。IGF- I 是一 70 Amino acid 的 Single-chain basic protein (74)；IGF- II 是 67 Amino acid 的 Slightly acidic sigle chain (75)，兩者的胺基酸序列有著 70%的相似度。大多於肝臟中被製造分泌，並經 IGF-BP 的攜帶在血液中會形 150Kda 的”Ternary” complex，其中會包含了”Acid-labile subunit” protein，而 IGF-BP 共有六種，其中以 IGF-BP 3 含量最高(76)。IGF-BP 的功能被認為能延長 IGFs 的半衰期和中和 IGFs 對細胞的影響，而 IGF-BP 會經由 IGF-BP proteases 的作用將 IGFs 釋放出來，使得 IGFs 能對細胞

產生作用(77)，IGFs 對細胞造成影響主要透過其位在細胞膜上的接受體，進而造成訊息的傳遞。

(一) Insulin like growth factors receptor

(1) IGF-I receptor

IGF-I receptor (IGF-IR) 是一個 Heterotetrameric glycoprotein，由兩個 706 胺基酸的 α -subunits 和兩個 627 胺基酸的 β -subunit 形成一個四聚體 (78)，而 α -subunit 為 Ligand 結合的區域，而 Ligand 主要結合在 α -subunit extracellular domain 的 Cysteine-rich 的區域，並活化 Cytoplasmic β -domain 上的 Tyrosine kinase (78)。而 β -subunit 為 Transmembrane 的 Protein。 α -subunit 和 β -subunit 之間以 Disulfide 相連接 (78)。IGF-IR 的基因在人類 Chromosome 15q 25-q26 (79)。

(A) Extracellular domain / ligand binding: IGF-I R 和 Insulin receptor 在胺基酸序列有 50% 以上的相似度(78)，被認為 Insulin 和 IGF-I 均能結合在彼此的 Receptor 上，但 IGF-I 對於 IGF-IR 的親合力大於 Insulin 有 1000 倍之多，而 IGF-II 被證實也能結合在 IGF-IR 上，且結合的親合力只低於 IGF-I 的親合力 2-15 倍左右(79)，而在 IGF-I R 的結構功能的探討上，多使用 Antibody 來阻斷 IGF-I 結合在 IGF-IR α -subunit 的 Cysteine-rich 的區域 (80)，尤其以 α -IR3 最為常

見，而 α -IR3 也能阻斷 IGF-II 對於 IGF-IR 的訊息傳遞 (81)。

(B) Cytoplasmic domain: β -subunit 的 Cytoplasmic portion 為一高度保留的 Tyrosine kinase catalytic domain，當 IGF-I 結合於 IGF-IR 時能造成 Tyrosine 和 Serine residues 磷酸化，而對於 IGF-IR 所活化的訊息傳遞， β -subunit tyrosine kinase 的存在是必需的 (82)。

(C) IGF-IR signal transduction (83)：當 IGF-I 結合在 IGF-IR 後會活化 Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)，IRS-I 主要與 IGF-IR β -subunit 的 947-950 殘基結合(84)，而 IRS-I 為 185KDa 的蛋白質(85)，包括了 21 potential tyrosine phosphorylation sites，並含有 6 個 YMXM sequence 為與其他蛋白結合的 Recognition motif，其中包含了：Src homology 2 (SH2) domains (82)，而與此 SH2 domain 結合的有 Grb2、GAP、SH-PTP2、p85、Nck、Shc，經活化的 IRS-1 會活化兩條途徑，一為活化 PI₃K (phosphatidylinositol (PI) 3 kinase，會使 Glucose transport 上升及活化 p70S6 kinase 造成 Mitogenesis (86)。二為透過 Grb2-Sos complex 的結合，結合 Mitogen-activated protein (MAP) kinase (Ras-Raf-ERK)，調節基因的表現 (87,88)，亦發現 Autophosphorylated IGF-IR 能直接活化 PI₃ kinase 的 p85 domain，不需透過 IRS-1(89)。

(2) IGF- II receptor

The IGF- II receptor 是一個 Single-chain membrane-spanning glycoprotein，且為 Cation-independent mannose-6-phosphate receptor (90)，為 2451 個 amino acid 所組成，蛋白結構包括了：一個較大部分的 Extracellular domain (2264 amino acid)、Transmembrane region (23 amino acid) 和一個 Carboxyl-terminal intracytoplasmic domain (164 amino acid) (91,92)。人類 IGF- II R 為在染色體的 6 q25-q27 (93)，為一高度保留的基因，在不同物種間有很高的相似度(147)。在 Extracellular domain 有 15 個 Contiguous segments (94)，每一個區域有 8 cysteines Repeating。Motif 13 為 43 個胺基酸的 Fibronectin type II repeat，其能與 Collagen 結合 (94)；Repeating motif 1-3 稱為 M-6-P binding domain 1；Repeating motif 7-9 稱為 M-6-P binding domain 2，mannose-6-phosphate (M-6-P) 結合的位置(95)；而 Repeating motif 11 為 IGF- II binding region，此一區域為 IGF- II 結合的位置，且只有在 Mammalian 的 receptors 當中才存在(96)。而當 Ligand 結合在 IGF- II R 上時，IGF- II R 會與 Lysosomal enzymes 結合，形成 Endosomal / prolisosomal 的間隔，將 Ligand 給 Proteolysis，結束後 Receptor 會在回到細胞膜上(90)。固 IGF- II R 能調節 IGF- II 的作用，為一 Growth factor clearance (97)。而在 IGF- II R 的 Intracytoplasmic 的區域，除了

有各種不同 Subcellular compartments 形 Endocytosis 結合的位置(98)，還有能與 Inhibitory GTP-binding protein (Gai-2)行偶合作用的區域 (99)，且亦發現有 Protein kinase 的磷酸化的位置，並在 COOH-terminal tail 的區域能與 G $\beta\gamma$ -subunits 結合(99)。

綜合上述 IGF- II R 能與 GTP-binding protein(Gai-2)行偶合作用，並在 IGF- II 結合在 IGF- II R 上時，會刺激 GTPase 與 Gai2 結合，並活化 Gai2。而在 3T3 cells 中，更發現 IGF- II 透過 IGF- II R 經由活化 Gai2，進而增加細胞內 Ca²⁺ influx (100) 和 DNA synthesis (100)。

(二) The IGF axis and programmed cell death.

The insulin-like growth factor system 是由 Ligand、Receptor、Binding protein 交互作用而成。The ligand 有二：IGF-I 和 IGF- II；主要在肝臟中產生可行 Endocrine 及在部份組織中，可自行分泌行 Paracrine 和 Autocrine，來對細胞造成影響。而 IGF-I 和 IGF- II 主要是透過 IGF-I R 造成 Cellular actions，而 IGF-IR 為一 Tyrosine kinase receptor，下游路徑包括了：IRS-1、Shc、Ras、Raf and Mitogen-activated protein (MAP) kinase (101)。而 IGF- II R 猜測為一 Tumor suppressor gene，除了發現 IGF- II R 能將其 Ligand IGF- II 行 Endocytosis，由 Lysosome 消除，減少 IGF- II 經由 IGF-I R 對細胞所

造成的生長刺激(102);並發現 IGF- II R 參與在 Cytotoxic T cell 所誘發的凋亡反應當中(103)。近幾年更發現在 IGF- II R 的 Extracellular domain 的區域,不只含有 M-6-P 及 IGF- II 的 Binding site,更包含了: Leukemia inhibitor factor(104)和 Retinoic acid(105)和 Urokinase-type plasminogen activator receptor(106)和 The mannose 6-phosphate groups of glycosylated latent transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)(107),而 IGF- II R 能將 LIF 形成 Lysosome 給分解,且能將 TGF- β 1 的側鏈移除進而活化 TGF- β 1,而活化 TGF- β 1 會造成生長的抑制。

由此可知 IGF- II R signaling pathway 不同於由 IGFs 經 IGF- I R 造成細胞的增生和分化,IGF- II R signaling pathway 為抑制生長和促進凋亡的發生。在 IGF- I、IGF- II 及 IGF- IR gene knockout mice 中,顯示了 Severe growth deficiency,IGFs 透過 IGF- I R 為一重要調節 Fetal development 和 Differentiation 的機制(108)。而在循環系統中,IGF- I 和 IGF- II 均為具有高親合力的 IGF-BP 所攜帶,IGF-BP 會使的 IGFs 對其接受體失去親合力,而 IGF-BP 會經由 Phosphorylation proteolysis 和 Cell surface association 等作用,釋放 IGFs,換言之,IGFs 與 IGF-BP 結合時,便失去了與接受體結合的能力,可視為 IGF-BP 能抑制 IGFs 經 IGF-IR 的 Cellular actions(109)。

而經 IGF-IR 所活化多樣的訊息路徑中,發現 IGF-IR

所活化的 IRS-1 docking protein，並非 IGF-IR signaling pathway 造成 Antiapoptosis 所並必需 (110)，在眾多文獻中發現 IGFs 透過 IGF-IR 活化 PI₃K-protein kinase B /Akt pathway(111)及 Rat-extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway(112)，進而造成 Antiapoptosis 的作用；並會透過影響 Caspase 的活性及 Bcl-2 family 中的 Anti-apoptosis 和 Pro-apoptosis prtein 的量，其中 IGFs 能增加 Anti-apoptosis protein，如：Bcl-xL、Bcl-2 的表現量 (113,114)；減少 Pro-apoptosis protein (112)，如：Bax、Bcl-xs，抑制 Caspase 1.3.7 的活性 (112)，達到 Cell survtral signaling。

而 IGF-BP3 除了會影響 IGFs 與 IGF-IR 結合的能力外，還會增加 TGF-β1 (115)、Retinoic acid (116)、Tumour necrosis factor-α (117) and Anti-oestrogens (118) 等蛋白質表現量，造成 Anti-proliferation，而近幾年更發現 IGF-BP3 能直接造成 Apoptosis 的發生，而非透過與 IGFs 的作用 (119)，而其 Pro-apoptosis 的機轉尚未清楚，值得一提是 IGF-BP3 也是一個 Transcription factor，並猜測可能透過調節 Growth inhibitory 和 Apoptosis gene 的表現造成凋亡的發生。

而在另一方面，p53 (tumor suppressor gene) 為一 Nuclear phosphoprotein，在當 DNA 發生 Damage 時會被活化，造成 G1 cell cycle

arrest 和誘導 Apoptosis 的發生，而 p53 被證實能調節 IGF-BP3 的大量表現 (120)，IGF-BP3 可能為 p53 所誘導的 Apoptosis 中重要的調節者，更發現活化的 p53 會抑制 IGF-IR 和 IGF-II gene 的表達，進一步抑制了經 IGF-IR 的 Survival factor signaling。

(三) Insulin like growth factors and cardiac hypertrophy

肢端肥大的病患常伴隨著心室的肥大，且在此病患的血清中，有著高量的 IGFs；而在肌肉產生 Stretch 時，也發現 IGFs 的表現量增加 (122)；而不論是 IGF-I 或 IGF-II 兩者均能直接造成心肌細胞產生肥大的現象 (121、123)。而 IGF-I 造成心室肥大的訊息路徑，主要透過 IGF-IR/PI₃K/Akt/p70S6k signaling pathway (124)，而此一訊息傳遞路徑亦被證實有助於細胞的存活 (125)。而 IGF-II 造成心肌細胞肥大的機制中，可依其結合的接受體分為兩類：一為 IGF-I R-dependent pathway；二為 Lysosome-dependent pathway (126)。而不論是 IGF-I 或 IGF-II 其均會透過影響 L type Ca⁺⁺ channels (Voltage-dependent channels)，進而造成的心肌肥大，且 L type Ca⁺⁺ channels 的開啟在此經 IGFs 誘導的肥大機制中是必須的 (127)，顯示著在 IGFs 誘導的肥大機制中，可能存在著經 Ca⁺⁺ 活化 Calcineurin-NFAT 的訊息傳遞路徑。

而在 Acute myocardial infarction 的動物實驗中，IGF-I 和 IGF-II 被證實能夠保護心臟，減輕 Acute myocardial infarction 對心臟所造成的傷害，維持正常的心功能 (128)。且 IGF-I 和 IGF-II 能經由 IGF-I R 抑制心肌細胞的凋亡，使得受外力刺激下的心肌細胞能存活下來。

三、Molecular characteristics of pathological cardiac hypertrophy

(一)、Molecular characteristics of pathological cardiac hypertrophy

Myocardial hypertrophy 為心臟在面對各種刺激下的適應性反應，主要發生在 Heart failure 的早期，並會進一步造成個體的死亡。此種適應性反應是透過增加 Muscle mass，來維持正常心臟所需要的功能。而 Cardiac myocyte 在接受外來刺激下所產生的肥大現象，可分為三種型態：(1) Physiologic hypertrophy：此種肥大現象為 Cardiac myocyte 的厚度和長度呈現等比例的增加。(2) Concentric hypertrophy：為一增厚型的肥大，主要在於增加 Cardiac myocyte 的厚度，造成收縮的強度增強。(3) Eccentric hypertrophy：為一拉長型的肥大，主要在於增加心肌細胞的長度，造成收縮的速度增加。而 Concentric hypertrophy 和 Eccentric hypertrophy 都稱為 Pathological

cardiac hypertrophy (129)。而在 Pathological cardiac hypertrophy 中，Cardiac myocyte 除了 Cell size 有著明顯的變化，亦發現關於 Natriuretic peptides 和 Fetal contractile protein 的 Embryonic gene 大量表達(129)，這些基因中有： *β -myosin heavy chain (β -MHC)*，*skeletal α -actin* and *atrial natriuretic factor (ANF)* 都是心臟肥大重要的指標。

而 Concentric hypertrophy 在臨床上所造成心臟疾病又稱為 Hypertrophic cardiomyopathy，可經由兩心室中隔增厚，在心室壁增厚，左心室腔室變窄分辨出來。而 Eccentric hypertrophy 在臨床上所造成的心臟疾病又可稱為 Dilated cardiomyopathy，主要特徵為：左心室腔室擴張，兩心室中隔和左心室壁變薄。而 Hypertrophic cardiomyopathy 為一”Compensated hypertrophy”能維持受外力刺激下的心臟有著較長時間的正常心功能，減緩 Heart failure 的發生，而 Dilated cardiomyopathy 則為 Maladaptive ”decompensated hypertrophy”為 Heart failure 發生的前徵。而在心臟的重組中，由 Compensated hypertrophy 走向 Decompensated hypertrophy 通常為心肌細胞由肥大走向凋亡所導致的(130)。

由於 Adult cardiomyocytes 已失去 Cell cycle reentry 的能力，使得 Adult cardiomyocytes 不同於其他細胞，無法再行複製增生，但在心肌細中卻有著和癌細胞行增生作用時相同的訊息傳遞路徑，而這些訊

息路徑被認為與心肌細胞的肥大生長有關，而心肌細胞的肥大生長被認為開始於 Endocrine, Paracrine, Autocrine factors 的分泌，並結合於位在細胞膜上多樣的接受體，並活化了 Multiple cytoplasmic signal transduction cascades，進而影響 Nuclear factors，調節 Gene 的表現。而參與在心肌肥大的分子訊息遞的機制，重要的傳遞者(Transducers)包括了：Specific G protein isoforms、Low-molecular-weight GTPase (Ras、RhoA、and Ras)、Mitogen-activated protein kinase cascades、Protein kinase C、Calcineurin、gp130-signal transducer and Activator of transcription、Insulin-like growth factor I receptor pathway、Fibroblast growth factor and Transforming growth factor β receptor pathways。而這些有關於心肌肥大路徑中的傳遞者(Transducers)彼此有著相互連接的關係，顯示在心肌肥大的過程中，多樣的分子和多種不同的訊息傳遞路徑參與其中 (131)。

(1) G protein and cardiac hypertrophy

Hetertrimeric GTP-binding protein (G protein) 能傳遞經 GPCR 所活化的訊息路徑，而在心血管的細胞中能經由 G protein 傳遞訊號的有三類：一為 β -adrenergic receptors (B-AR)，經 Epinephrine, Norepinephrine 刺激後能與 Gas 行偶合作用調節著 Heart rate 和 Myocardial contractility。二為 Cholinergic receptor 經 Acetylcholine 刺

激後與 Gai 行偶合作用。三為經 Angiotensin II 和 Endothelin-1 刺激下，所結合的接受體（如：AT₁），能與 Gαq 行偶合作用，一般認為此一路徑在心臟的病理性肥大上扮演重要角色。

當 Agonist 結合在 GPCR 時，會使得非活化的 Gα-GDP 轉變具活化的 Gα-GTP，進而與 Gβγ 分開，而活化 Gas 和 Gai 會抑制 Adenylyl cyclase (AC)；活化 Gαq/11 會活化 Phospholipase C (PLC)；而 Free Gβγ subunit 能直接增加 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling，Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity (132、133)。

(A) Gai in cardiac Disease

Gai 被發現在 Heart failure 的病人中大量上升，而活化的 Gai subunit 能抑制 AC 的作用，而 AC 主要的功能為催化 cAMP 的產生，並能活化 Protein kinase A-signaling pathway，透過抑制 Phospholamban，增加 SERCA2 ATPase，增加 Myocardial contractility；而 Gai 的大量表現被視為是 Compensated hypertrophy 進入 Decompensated heart failure 重要的促進者 (134)。

(B) Gas in Cardiac Disease

Gas subunit 的大量表現並不會影響 AC activity，但會增強與 β-AR 之間的偶合作用，如：Isoproterenol 便是經由 β-AR 與 Gas subunit 交互作用，刺激心臟收縮，並且會增加 Myocardial collagen

content 和 Fibrosis，使得心肌細胞由肥大轉變成凋亡，但 β -AR 和 β 2-AR 的過度表達並未發現有害於心臟，故 Gas subunit 有害於心臟訊息傳遞路徑並不清楚 (135)。

(C) G α q in heart Disease

α -AR agonist 包括了：Norepinephrine、Phenylephrine、Angiotensin II、endothelin 和 prostaglandin F 2α ，在與接受體結合後，均能促使接受體與 G α q 行偶合作用，活化 PLP，造成心肌的肥大。而在 G α q over-expressers transgenic mice 會造成 Eccentric ventricular remodeling、Resting sinus bradycardia and Left-ventricular contractile depression。顯示由 G α q 所活化的訊息傳遞路徑能夠促使 Cardiac hypertrophy 轉變成 Heart failure (136)。

(2) Low-Molecular-Weight GTPases in cardiac hypertrophy (RAS, RHOA and RAC)

Ras 為一個 Low-molecular-weight GTPase，能被 G protein-coupled receptors (GPCR)、Receptor tyrosine kinases (PTK)、Janus kinase 1 (Jak)和細胞內大量的 Calcium 所活化，進行 GDP-GTP exchange。而活化的 Ras 能進一步活化 Raf-1、PI 3 K、Small GTPase Ral

proteins、p190 GAP 和 Rho，而 Ras 也能活化 3 種 MAPK signaling branches [extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK 1 and 2)，c-Jun NH2-terminal kinase (JNKs) and P38]。在 Cultured cardiomyocytes 中，活化的 Ras 能增加的 Cell size 和 ANF expression；而在持續活化 Ras 的 Transgenic mice 中，顯示出 Cardiac hypertrophy 和 Diastolic dysfunction。而由 Ras 調節心室肥大的機制並未清楚，大致說來，Ras 和 Rac GTPase 可為 Prohypertrophic factors，而下游的 RhoA 可能為 Cardiac hypertrophy 的重要調節者 (137)。

(3) Mitogen-activated protein kinase signaling pathway

(A) MEK1 and 2 extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway and cardiac hypertrophy。

ERK 有兩個 Isoform：ERK1 和 ERK2 能被 MAPK kinase，MEK1 和 MEK2 活化，而 MEK1 和 MEK2 的上游為 Ras-1，A-Raf，B-Raf 和 MEKK1-3。在 Cultured cardiomyocyte 中，持續活化 MEK-1 會增加 ANF promoter activity，在 PE 誘導 Cardiomyocyte hypertrophy 中，ERK signaling 是必需的，但也有報導指出活化的 ERK 能增加 *c-Fos* 和 ANF promoter activity，但其 ERK 的抑制劑對於 Agonist 刺激下，所形成的 Hypertrophic morphology 或 Cytoskeletal organization 現

象並沒有改變。相反的論點卻指出活化的 ERK 能抑制心肌細胞的肥大，顯示不同 Agonist 刺激下，被活化的 ERK 對心肌細胞有著不同的作用機制 (138)。

(B) p38 and cardiac hypertrophy

p38 有四個 isoform，包括了：p38 α ，p38 β ，p38 γ ，和 p38 δ ，在心臟中大多為 p38 α ，p38 β 。p38 能被廣泛的 Stress 所活化，包括了：Chemical stress、Physical stress、Osmolar stress、Radiation stress 和 G protein-coupled receptor (GPCR)，而能將 p38 MAPKs 活化的上游包括了：Two MAPKKs；MKK3 和 MKK6。而能將 MKK3 和 MKK6 給活化的上游為：PAK、TAK1 和 MLK3。當心肌細胞處於 Mechanical deformation、GPCR ligands (Angiotensin II、Endothelin-1 和 PE)和 Mitogens 均能活化 p38，而活化的 p38 能影響 Cytoplasmic protein 和 Transcription factor，進而調節 Stress responsive signaling。而能被 p38 活化的分子包括了：MEF2、MAPKAPK 2 and 3、ATF-2、ELK-1、Chop、Max 等。

而在許多能造成心肌肥大的刺激和條件下，如：PE、Endothelin-1、Aortic-banded mice 和 Advanced coronary artery disease，均發現 p38 MAPK 的活性大量上昇，且在持續表達 MKK3 或 MKK6

factor (p38 的上游), 發現會造成心肌的肥大和 ANF 的發達; 但在心肌細胞的培養中加入 PE 或 Endothelin-1, 造成的心肌細胞肥大的現象, 在 24 小時時, 加入 p38 的抑制劑 (SB203580), 並無法阻斷肥大現象, 但在 48 小時時加入 SB203580 卻減弱了肥大的現象, 顯示 p38 MAPK 的訊息路徑, 在對於 Agonist 刺激下所產生的心肌細胞肥大, 可能還有著其他特別的角色 (139)。

(C) C-JUN NH2 TERMINAL KINASE AND CARDIAC HYPERPTROPHY

在 Mammalian cells 中, JNK 或 SAPK (stress-activated protein kinase) genes 有三個不同的種類, 分別為 *JNK1*、*JNK2*、*JNK3*, 而在心臟中主要為 *JNK1*, *JNK2*。而在活化 JNK 的分子路徑上為: GLK、HPK1、N₁K、MST1 和 Ras 均能活化 MEKK1 and 2 進而活化 MKK4 and MKK7, 再活化 JNK1, JNK2。

將心肌細胞處於 Stress 刺激下和 GPCR 的 agonist 作用下, 及在 Load-induced cardiac hypertrophy、Myocardial infarction 的大白鼠中和 Human heart failur 中, 發現 JNK 的活性大量上升; 在 *in voro* 和 *in vitro* 的實驗中, 均證實 JNK1 and 2 在 Cardiac hypertrophy 扮演決定性的調節者。而在持續活化的 MEKK1 (JNK1 and 2 的上游) 中, 能誘導有關於肥大基因 (Hypertrophy-associated gene) 的表達, 但也發現到

持續活化的 MEKK1 (JNK1 and 2 的上游) 能夠抑制由 PE 所誘導的 Sarcomeric organization, 顯示了兩種不同的調節方式。並在 Agonist-induced cardiac hypertrophy 表達 Dominant-negative Mkk4 (JNK1 and 2 的上游) 減弱了肥大現象, 顯示在 Cardiac hypertrophy 中, JNK 為一必需的調節者 (140)。

(4) Protein kinase C

Protein kinase C (PKC) isoforms 為 Ubiquitous lipid-binding serine-threonine kinase 家族的一員, 大致可分為三類, 一為 Conventional (cPKC) 為 Calcium dependent (nPKC); 二為 Calcium independent 均為 DAG 活化; 三為 Atypical (aPKC) 主要由 Lipid 活化; 而 PKC isoform 被活化後會有 Translocation 的現象, 如在心肌細胞中加入 α -AR 的 Agonist 刺激下, 發現 PKC β 1 由 Cytosol 進入 Nucleus; PKC β II 由 Fibrillar stored 到 Perinucleus 和 Sarcolemma; PKC ϵ 由 Nucleus 和 Cytosol 到 Myofibrils; 而 PKC ϵ 到 Perinuclear region; 而 PKC isoforms 的活化和轉移現象由 RACKs (Receptor for activated C kinase) 所調節, 而 RACKs 會經由與 RACK binding peptide 和 Pseudo-RACK peptide 的調節, 決定其是否能與 PKC 上的 RACK binding site 結合而造成 PKC 的活化。

在 $G\alpha_q$ 所誘導心室肥大的機制中，發現 $PKC\epsilon$ 和 $PKC\alpha$ 的活性上昇，且活化 $PKC\epsilon$ 和 $PKC\alpha$ 能調節 Calcium channel activity。而 $PKC\beta$ 能將 Troponin-1 磷酸化，被認為會使得心臟失去收縮功能。而若抑制 $PKC\epsilon$ 的活化會發現左心室壁有變薄的現象，此現象和因 Dilated cardiomyopathy 造成心臟衰竭有著相似之處 (141)

(5) Calcineurin and cardiac hypertrophy

Calcineurin 是一 Serine-threonine phosphatase 能被 Calcium-calmodulin 活化。Calcineurin 是由兩部份所組成，一為 61-KDa catalytic subunit，被稱為 Calcineurin A，二為 19-KDa calcium-binding EF hand domain，而 Catalytic subunits，由三個 gene 轉譯而成，分別為 Calcineurin A α 、A β 、A γ ，而在心臟中只存在著 Calcineurin A α 、A β 。當 Intracellular calcium 為高濃度時，Calcium 會與 Calmodulin 結合，進而活化 Calcineurin，而活化的 Calcineurin 能將在 Cytoplasm 的 NFAT transcription factor family 給去磷酸化，造成 NFAT 移入細胞核內，開啟 Immune response gene 的表現，而 Cyclosporine A 和 FK506 能抑制 Calcineurin 將 NFAT 去磷化，阻止 NFAT 移入核內。Calcineurin-NFAT signaling 被證實會造成 Cardiac hypertrophy，而 Cyclosporine A 和 FK506 能抑制由 Calcineurin 所誘導的心室肥大 (142)

(5) Gp130-signal transducer and activator of transcription and cardiac hypertrophy

Cytokine 當中的 IL-6 family 能調節心肌細胞的 Maturation 和 Hypertrophy，如：Cardiotrophin-1 為 IL-6 cytokine 的一員，能經由與 gp130 和 Leukemia inhibitor factor recaptor (LIFR)所組成的 Heterdimer receptor 結合；而當 Ligand 結合在 gp130-LIFR complex 時，能將 Janus kinase (JAK)給磷酸化，而帶有磷酸根 JAK 會再磷酸化 gp130，而此時 gp130 會產生一個為 SH2 domain-containing protein 的 Docking site，而 Signal transducer and activator of transcription (STAT) family 為一 SH2 domain-containing factors，會與 gp130 結合而被磷酸化，而磷酸化的 STAT 會形成 Homo 或 Heterdimerization，移入核內。而活化的 gp130 和 LIFR 也能活化 MAPK pathway (ERK, JNK)，且能經由活化 JAK -1 磷酸化 PI₃K。而 IL-6 cytokine family 能經由 gp130-LIFR complex 活化 JAK-STAT pathway 調節 Cardiac development、Hypertrophy 和 Survival (143)

(6) IGF- I transduction and cardiac hypertrophy

IGF- I 和 IGF-II 能經由 IGF-I R 促使 Cellular

proliferation 和 Differentiation，而 IGF-1 R 為一 Tyrosine kinase receptor 會活化 Insulin receptor substrates (IRSs)1 and 2，進一步造成 Crk、Shc、Grb-2、Sos 和 Ras 的活化，IRS 能藉由 SH2 domain 與 PI₃K 連接，進而活化 PI₃K，而活化的 PI₃K 會經由 PDK1 活化 AKT (protein kinase B) 和 p70/p85 S6K 調節 Translational 和 Cell survival。IGF signaling 能調節 Cardiac homeostasis 和 Maturation，而 IGF-PI3K-AKT-p70S6k signaling pathway 被證實在調節 Cardiac hypertrophy、Viability and Homeostasis 扮演重要的角色 (144)

(7) Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor β in cardiac hypertrophy

Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)和 Transforming growth factor β (TGF- β)為 Peptide growth factors，能刺激初代培養的心生大白鼠(Rat neonatal ventricular myocyte)誘導 Fetal-like gene 表達，並產生肥大的現象。FGF-2 和 TGF- β 能在心臟中由 Autocrine 和 Paracrine 產生，而 FGF-2 所結合的 Membrane receptor 為一 Tyrosine kinase receptor；而 TGF- β 所結合的 Membrane receptor 為一 Serine-threonine kinase receptor。並被證實 FGF-2 是透過 MAPK cascade 造成心肌細胞肥大，而 TGF- β 則是透過活化 TAK1，進一步

磷酸化 p38 和 JNK 造成心肌細胞肥大 (145)

(二)、Cardiomyocytes and apoptosis

Cell death 大致可區分為兩類：一為 Apoptosis，二為 Necrosis。兩者之間有著根本的不同。在 Necrosis 的狀態下，細胞會呈現膨脹，Mitochondria dilate、Organelles dissolve、Releasing cytoplasmic material 引起 Inflammatory response。而 Apoptosis 的狀態下則為：Cytoplasm shrinks、Chromatin condenses，但 Organelles 仍然保持其完整性，產生 Plasma membrane blebs，其外膜表面顯現出 Phosphatidylserine，Plasma membrane 並不會破裂，會進一步產生 Membrane-enclosed vesicles (Apoptotic bodies)，會經 Phagocyte 清除，並不會引起 Inflammatory response。而且 Apoptosis 通常會活化 Endonucleases 造成 Oligonucleosomal fragments 和活化 Caspase(146)。

Apoptosis (Programmed cell death)對正常的發育和 Tissue homeostasis 是一必須的生理現象，也就是說 Apoptosis 有別於由 Toxins、Physical stimuli、Ischemia 所產生 Cell necrosis 的現象，而是維持細胞在增生與凋亡間的平衡，而當細胞凋亡的平衡發生錯誤會造成如 Cancer、Autoimmune 和 Neurodegenerative disease，而在心血管系統中，也有許多疾病是與 Apoptosis 有著相關性，如：Dilated

cardiomyopathy (147)、Ischemic cardiomyopathy (148)、Arrhythmogenic right ventricular dysplasia (149)、Acute myocardial infarction (150)、Atherosclerosis (151)、Myocarditis syndromes (152) 和 Congenital atrioventricular block (153)。而就 Dilated cardiomyopathy 來說明，主要發生的原因在於心肌細胞接受了過度而長時間的壓力和刺激下，除了以肥大來代償維持正常心功能，也出現了心肌凋亡的現象，對於成年人而言，心肌細胞早已失去了再生的能力，故細胞凋亡便會造成心肌數目的減少，無法維持其正常收縮力，導致在左心室內的血液無法有效地經由主動脈通往全身，造成心衰竭的現象。

而在 Apoptosis 形成的機轉中，Caspase 為主要調控凋亡發生的蛋白，為一 Aspartate-specific proteases，共有 10 種不同的 Isoform；就結構而言，Caspase 由 Prodomain domain 和 Enzymatic domain 所組成。而當 Caspase 被切割為 Prodomain 和 Enzymatic domain 時，二個 Prodomain domain 和二個 Enzymatic domain 會進行組合，形成一個四聚體，此時的 Caspase 便具有活性。而 Caspase 下游的受質可分為三類：一為 Nuclear proteins；二為 Regulatory proteins；三為 Cytoskeletal proteins，共同參與在細胞凋亡的機轉中 (154)。

依 Caspase 被活化的方式，可區分為二種不同的路徑，一為 Death Receptor pathway；二為 Mitochondrial pathway。另外還存在

著 Regulatory Protein 能夠調節此兩種路徑，所造成的細胞凋亡，可分為三大類：一為 Inhibition of mitochondrial apoptosis initiation (如：Bcl-2)；二為 Inhibition of receptor-mediated caspase activation (如：FL1P)；三為 Inhibition of caspase (如：LAP) (154)。

Death receptor pathway 主要為 Extracellular death signal protein (TNF- α , FasL, TRAIL 和 Apo-3L)，連接在細胞膜上的接受體 (TNFR1, Fas, DR3, DR4)，會促使接受體形成 Homotrimer，並藉由接受體上的 Death domain 吸引細胞質中具有 Death domain 的 protein，如：TNF R-associated death domain protein (TRADD)，Receptor-interaction protein (RIP)與之結合，再經由此蛋白上的 Death effector domain (DED)切割 Caspase Pro-domain，進而活化 Caspase 造成細胞凋亡的發生 (154)。

而 Mitochondrial pathway 中，，主要由三個蛋白與 dATP 形成聚合體切割 Caspase 3，進而造成細胞的凋亡，而這三個蛋白為：Apaf-1、Cytochrome c (Apaf-2)和 Caspase 9 (Apaf-3)。而 Cytochrome c 在正常的生理狀態下時，位於 Mitochondrial 的 Intermembrams space，而當 Cytochrom c 由 Mitochondrial 中釋放到細胞質中時會與 Apaf-1 結合，而 Apaf-1 會用其 N 端與 Caspase 9 (Apaf-3)的 Prodomain 結合，如此形成的三聚合物，再經由與 dTAP 或 ATP 的結合，如此才具有

活性切割下游的 Caspase 3。而在調控 Mitochondrial 釋放 Cytochrome c 的機制中，Bcl-2 protein family 扮演重要的角色，依其促進或為抑制 Cytochrome c 的釋放的角色，可區分為 Antiapoptosis protein：Bcl-2、Bcl-x_L、Mcl-1、Bcl-W 和 A1 及 Pro-apoptosis protein：Bax、Bak、Bad、Bik、Hrk、Bid 和 Bcl-Xs 兩大類（154）。

而對於由 Death receptor pathway 活化 Caspase 所造成的凋亡中，亦有蛋白能透過抑制 Death receptor 或 Caspase 的活化，來抑制凋亡的發生，這些蛋白有：X-linked IAP、Neuronal IAP、c-IAP1、c-IAP2、Surviviin、FLIP、I-FLICE、CASH 和 FLAME-1（154）。

另外在正常細胞內，亦存在著 Anti-apoptosis signal 能與 Apoptosis signal 相互抗衡，維持著一個平衡的狀態，而細胞凋亡的發生便是此一平衡狀態失調所造成，而在細胞內 Anti-apoptosis signal 主要可分為三大類：一為 Cytokines (TNF- α) 經 NF- κ B 開啟存活基因的訊息路徑；二為 Growth factor (NGF、IGF-I、PDGF) 經 PI₃K-AKT/PKB，進而磷酸化 Bad 抑制 Cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質中的訊息路徑；三為 Paracrine factors (Cardiotrophin-1)：經 Ras-Raf-1-MEK-ERK 的訊息路徑（154）。

而在 Apoptosis signal 主要是，當細胞接受 Stress stimuli 會活化 Ceramide-CAPK/CAPP 訊息路徑或 ASK-SEK-JNK/p38 訊息路

徑，造成凋亡的發生。另外當有 UV 或 Irradiation，Chemotherapeutic drugs 造成 DNA 的損傷，此時 p53 會大量上升，而 p53 能造成 Cell cycle arrest，亦能增加 Fas、Bax 和 IGF Binding protein 3 的表現量，進一步造成凋亡（154）。

心肌細胞在正常的生理環境下，並不會有凋亡的現象，但當心肌細胞處於高壓的環境下時，心肌細胞內便存著 Hypertrophy、Apoptosis 和 Survival 等不同的訊息途徑，彼此之間會相互拮抗決定著心肌細胞的命運，而對接受外力刺激的心肌細胞而言 Compensatory hypertrophy 維持了個體正常的心功能，而心肌細胞的凋亡，則開啟心衰竭的發生。在眾多的訊息路徑中，分別調控著 Hypertrophy 和 Apoptosis 的訊息路徑，並未被嚴格的區分，而其中已被證實的有，由 Cytokines 中的 Interleukin-6 family 經 gp130-L1F 接受體所活化的訊息路徑，能抑制凋亡的訊息路徑，使得心肌細胞存活於下來；而 p38- β 所誘發的路徑為心肌肥大的訊息路徑；p38- α 所誘發的路徑為心肌凋亡的訊息路徑（154）。

動機

在臨床上，Angiotensin II (Ang II) 的抑制劑 (Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors 和 Ang II receptor antagonists) 常用來治療心血管相關的疾病，如：Hypertension、Cardiac hypertrophy、Heart failure 等。而在施行腹動脈結紮的動物實驗中，指出 Ang II 的迅速分泌，為造成 Pathological cardiac hypertrophy 的主因。先前的文獻指出，Ang II 主要透過 JNK、ERK 和 Calcineurin 三條路徑以及透過刺激 Growth factors 的 Autocrine，協同造成 Cardiac hypertrophy；經由 Ang II 刺激所分泌 Growth factors 包括了：TGF- β 、PDGF、Basic FGF、Endothelin-1 和 Insulin-like growth factor。而 Insulin-like growth factor-II (IGF-II) 主要由肝臟所製造，並隨著年齡的增長，IGF-II 在肝臟的含量會迅速的下降，被認為是一胚胎基因；但當心臟發生病變時，卻發現在心臟中的 IGF-II 大量上升，而 IGF-II 亦被證實能直接造成 Cardiac hypertrophy，但 Ang II 能否刺激心肌細胞分泌 IGF-II 則尚未有文獻探討。

在 Pathological cardiac hypertrophy 的形成中，心肌細胞由過度肥大轉變為凋亡被認為是導致心衰竭 (Heart failure) 的主因，故在本實驗中，便以探討 Ang II 導致心肌細胞凋亡的路徑中，IGF-II 是否參與其中，如果 IGF-II 有參與在 Ang II 導致的心肌細胞凋亡中，那麼 Ang II

是透過什麼路徑增加 IGF-II 的表現，且 IGF-II 所扮演的角色為何？

以及 IGF-II 又是經由什麼路徑造成心肌細胞的凋亡？

材料與方法

一、實驗材料：

1. Cell culture

FBS(Fetal Bovine serum) – Hyclone

DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) – Sigma

L-Glutamine – Sigma

D-Glucose – Sigma

Sodium bicarbonate – Sigma

50mM Tris-base – USB

0.5 M NaCl – Sigma

1% NP40 – Sigma

1% Glycerol – ANGUS

Protein kinase inhibitor – Roche

Angiotensin II (10^{-6} M) – Sigma

IGF-II (10^{-8} M) – Sigma

Rat antisense IGF-II : C A C T g g g A T C C C C A T – 生工

2. 萃取 RNA

UltraSpec RNA reagent — Biotecx
Chloroform — Sigma
Isopropanol — Sigma
Ethanol — Merck
Diethyl pyrocabonate (DEPC) — Sigma

3. RT-PCR

M-MLV Reverse Transcriptase — Promega
M-MLV Reverse 5× Buffer — Promega
Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor — Promega
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs): dATP, dCTP, dGTP, dTTP
— Promega
DyNAzyme II (DNA polymerase) — Finnzymes
10×Buffer for DyNAzyme — Finnzymes
Primer — 生工有限公司 (MDBio)

4. DNA fragmentation

1% NP40 — Sigma
20mM EDTA — Sigma
50Mm Tris-HCl — USB
PBS — Gioco/BRL
20% SDS — Sodium dodecyl sulfate
RNAase A — Roche
Proteinase K — Roche
3M Sodium Acetate (ph 5.2) —
100% Ethanol — 慕容科技

3. DNA gel 及 electrophoresis

Agarose— Amresco

5x TBE solution—生工有限公司(MDBio)

100 bp ET marker—真興實業股份有限公司

4. Western Blot

Acrylamide—Sigma

APS (Ammonium persulfate)—Sigma

Bis-acrylamide—Sigma

Bromophenol Blue—Sigma

3,3'-Diamine Benzidine (DAB)—Sigma

Glycerol—ANGUS

Glycine—USB

37% H₂O₂—Sigma

Mercaptoethanol—Pharmacia Biotech

Methanol—Merck

Magnesium chloride (MgCl₂)—聯工化學試藥

Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20)

Potassium chloride (KCl)—聯工化學試藥

Potassium phosphate, dibasic (K₂HPO₄)—聯工化學試藥

Potassium phosphate, monobasic (KH₂PO₄)—聯工化學試藥

Sodium chloride (NaCl)—聯工化學試藥

Sodium dodecyl sulfate (SDS)—Sigma

TEMED—PlatinumPlus™

Tris-base—USB

Tris-HCl—ANGUS

ProSieve® color protein marker—BMA

安佳脫脂奶粉

5. 抑制劑

MEK Inhibitor U0126 – Promega

LY 294002 – Promega

SB 203580 – Promega

SP 600125 – Promega

CsA –

6. Antibody

IGF-I Santa Cruz Biotechnology

IGFIR β subunit NEO MARKETS

IGF-II Santa Cruz Biotechnology

IGF-II receptor Transduction Laboratories

Caspase 8 Santa Cruz Biotechnology

Caspase 9 Santa Cruz Biotechnology

α -tubulin NEO MARKETS

goat anti-mouse IgG-HRP SERVING SCIENCE TOUGH IMMUNOCHMISTRY

goat anti-rat IgG-HRP SERVING SCIENCE TOUGH IMMUNOCHMISTRY

goat anti-rabbit IgG-HRP SERVING SCIENCE TOUGH IMMUNOCHMISTRY

rabbit anti- goat IgG-HRP SERVING SCIENCE TOUGH IMMUNOCHMISTRY

7. Primer

Rat IGF-II forward primer : C T T g T T g A C A C g C T T C A g T

Rat IGF-II reverse primer : g T T C A C T g A T g g T T g C T g g A

Rat IGF-II forward primer : g C A A g g g C A T A A A g g T g A A

Rat IGF-II reverse primer : T g T A A g T C A C C C T g T g C A A

Rat GAPDH forward primer: T C C C T C A A g A T T g T C A g C

AA

Rat GAPDH reverse primer : A g A T C C A C A A C g g A T A C A
T T

二、實驗設備

名稱	廠牌
GeneAmp PCR system	Techgene
Spectrophotometer	Hitachi U-2001
Centrifuge	Kubota-1720
Shaker	TKS
Millipore	Nalgene
水浴加熱器	Firstek
PCR tube	Scientific Specialtie Incorporated
高壓殺菌釜	Tomin TM322
pH meter	Jenco microcomputer model 6200
加溫攪拌器	Corning
Transilluminator	National Labnet Company
Homogenizer knots tissue grind	Wheaton
Ultravidet transilluminator	Ultra • LUM
Vortex mixer model VM-100	PIGISYSTEM LAB.
CO ₂ Water-Jacketed incubator	NUAIRE
Membrane Filter (Dia.47mm ϕ)	Whatman
DNA 電泳槽	Major Science
DNA 電泳槽專用電源供應器	Major Science
數位元影像儀	Kodak
Mini-PROTEAN 3 system	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Electrophoretic	Bio-Rad

Transfer Cell	
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech
Explorer Balances	Ohaus
Inverted Microscope	Nikon

二、實驗方法

(一)細胞培養

本實驗中使用的細胞株為胚胎大白鼠心肌轉型細胞株(H9C2 cells)，培養於含有 10% Fetal bovine serum(FBS: Hyclone)、1% 抗生素的 Dulbeco's Modified Eagle Medium(DMEM:Sigma)；培養箱的設定為 5%CO₂, 37°C 恆溫的環境，每週更換培養液 3 次。使用 Serum-free medium 培養心肌細胞 Overnight 後，再以藥物處理心肌細胞，本實驗中使用的藥物包括了 Angiotensin II (10⁻⁸ M)、IGF-II (10⁻⁸ M)、IGF-II Ab、IGF-IIR Ab、IGF-IR Ab、IGF-II anti-sense、SP 600125 (JNK inhibitor)、CsA (Calcineurin inhibitor)、SB203580 (p38 inhibitor)、U0126 (MEK inhibitor)、Stautosprine(PKC inhibitor)、LY294002(PI3K inhibitor)。

(二)細胞蛋白質的萃取

將加藥處理後的細胞，除去培養液，以 PBS buffer 洗滌 3 次，加入 150 μl 的 Lysis buffer (50mM Tris pH7.5、0.5M NaCl、1.0mM EDTA pH7.5、1mM BME、1% NP40、10% glycerol、protease inhibitor cocktail table)，接著將細胞由培養皿刮下來，置於 1.5ml 之離心管(Eppendorf tube)，作用 30 分鐘，每五分鐘激烈震盪一次，接著於 4°C、12,000 轉速下離心 10 分鐘，取上澄液即可。

(三)蛋白質濃度測定

蛋白質的定量採用 Lowry protein assay，其原理為蛋白質先與鹼性

之銅離子作用，蛋白質中 Tyrosine 及 Tryptophan 再還原 Phosphomolibdate 而形成有顏色之複合物。此複合物之顏色強度與蛋白質中芳香族氨基酸之量成正比。本方法過程為當鹼性銅離子試劑與蛋白質中少數 Peptide bond 反應，產生低層次之 Biuret 顏色，其次當 Folin-Ciocalteu phenol 試劑加入後，與蛋白質中之 Tyrosine 及 Tryptophan 反應產生藍綠色之複合物，最後依比色法測其吸光度換算蛋白質含量。首先配製六組已知濃度之 BSA，體積 100~200 μ l，加入 1ml 的 Lowry's reagent，於室溫下反應 10 分鐘後，再加入 100 μ l Folin Ciocalteu phenol，於室溫下至少反應 30 分鐘。最後以波長 580nm 可見光之析光度測定六組已知濃度 BSA 之吸光值，製備標準曲線(Standard curve)。接著再以相同方法偵測樣品之 O.D.值，即可依據標準曲線求得樣品蛋白質濃度。

(四)西方墨點(Western Blot)

將定量後之樣品蛋白質取 40 μ g，以 PBS buffer 加入 40 μ g 樣品中至體積為 20 μ l，再加入 5 μ l Loading dye 使總體積為 25 μ l，將其混合均勻。接著將樣品蛋白質置於 99 $^{\circ}$ C Incubator 中 Denature 10 分鐘，混合均勻、Spin down 後再進行 SDS-PAGE 電泳分析。SDS-PAGE 之上層膠為 4% 之 Stacking gel，下層膠為 10%或 12% (依所欲測定之蛋白質分子量大小決定)之 Separating gel。將製備完成之膠板固定至電泳裝置，並以電泳緩衝液 (Running buffer) 注滿上下電泳槽，而後將處理過之蛋白質樣品溶液(25 μ l)注入膠板上的 U 型槽(Well)中，以 100 伏特進行電泳分析約一個半小時。

待電泳結束即可進行轉漬(Transfer)，首先將整個 Transfer holder 打開，以白色為底部，於其上分別平鋪三層不同浸濕之菜瓜布、Whatman 3M 濾紙及預先以甲醇(Methanol)浸濕的 NC paper，接著將取出之下層膠體(Gel)平鋪其上，並確定膠體與 NC paper 之間並無氣泡後，接著分別依次於膠體上覆蓋一層 Whatman 3M 濾紙及菜瓜布，將 Transfer holder 固定後，即可置於 Electrotransfer tank，並注入 Transfer buffer (參閱附錄二)，於 4 $^{\circ}$ C 下進行 100 伏特電轉漬(Transfer) 1 個小時。轉漬完成後，

取出 NC paper 並加入 Blocking buffer 於室溫下搖動 1 小時後，加入 1 級抗體(2 μ l/ml blocking buffer)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應整夜(Overnight)或室溫下反應 2 小時，之後以 1 \times TBS buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘。而後加入 2 級抗體(2 μ l/ml 1 \times TBS buffer)，並於 4 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，加 1 \times TBS 清洗 10 分鐘。最後分別加入 Substrate buffer (2~3ml)、37% H₂O₂ 及(4~5 μ l) DAB 進行呈色反應即可。

(六)細胞 RNA 的萃取

將加藥處理後的細胞，除去培養液，以 PBS buffer 洗滌 3 次，加入 1ml UltraSpec，接著將細胞由培養皿刮下來，置於 1.5ml 之離心管(Eppendorf tube)，並於冰上(4 $^{\circ}$ C)靜置 5 分鐘，而後加入 200 μ l 氯仿(Chloroform)並劇烈搖晃混合均勻後，於冰上靜置 5 分鐘，接著以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 條件離心 15 分鐘。離心後將上層液移至另一新的離心管，加入等體積之 Phenol-chloroform 混合液混合均勻，再以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 條件離心 10 分鐘。接著將上層液移至新離心管，加入等體積之 Isopropanol，混合均勻後於冰上靜置 10 分鐘，以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 條件離心 10 分鐘，接著將 Isopropanol 移除，所得之白色沈澱物(Pellet)再以 75%酒精(Ethanol)清洗兩次，每次皆以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 條件離心 5 分鐘。最後使移除酒精之沈澱物自然乾燥(約 20~30 分鐘)後，加入 50 μ l 之滅菌 0.1% DEPC-H₂O 溶解沈澱物，並於 55 $^{\circ}$ C Incubator 中反應 10 分鐘，接著於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中貯存隔夜(Overnight)。最後測其吸光值(OD₂₆₀)以便換算所萃得之 RNA 濃度。

$$\text{RNA 濃度}(\mu\text{g/ml}) = \text{稀釋倍數} \times \text{OD}_{260} \times 40 (\mu\text{g/ml})$$

(七) Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. Reverse Transcription Reaction :

RT (reverse transcriptase) : 取 2 μ g 之 RNA，加入適量之 0.1% DEPC-H₂O 至體積為 25.75 μ l，以 70 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘後，再分別加入

0.25 μ l RNase inhibitor (40U/ μ l)、10 μ l 5 \times RT buffer (Promega ; 50mM Tris-HCl、75mM KCl、3mM MgCl₂ 及 10mM DTT)、4 μ l dNTP (Promega ; 10mM)及 5 μ l Oligo dT，接著於溫度循環處理機 42 $^{\circ}$ C 執行 5 分鐘後，加入 5 μ l 40U reverse transcriptase (1 μ l 200U reverse transcriptase + 4 μ l 0.1% DEPC-H₂O)，並於 42 $^{\circ}$ C 反應一小時後，再以 99 $^{\circ}$ C 執行 5 分鐘，最後維持於 4 $^{\circ}$ C 保存反轉錄所得之 cDNA 產物。

2. 引子合成 (Primer Synthesis) :

本實驗所需的引子(Primer)皆為生工公司製備，各組引子之條件設定請參閱 (表 6-1)。

3. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction) :

取 5 μ l cDNA 分別加入 11 μ l ddH₂O、2.5 μ l Forward primer、2.5 μ l Reverse primer、1 μ l dNTP (10mM)及 2.5 μ l 10 \times PCR buffer (DyNA ; 10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、50mM KCl 和 0.1% Triton X-100)，混合均勻後置入溫度循環機以 94 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘後，加入 0.5 μ l DNA polymerase (DyNA, 2U/ μ l)，進入第一個循環處理 94 $^{\circ}$ C，1 分鐘 \rightarrow Annealing 溫度，30 秒 (Annealing 溫度依 Primer 而決定，參閱表 6-1) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C，1 分鐘。其中循環次數依 Primer 及表現量來決定 (參閱表 6-1)。接著再以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，最後以 4 $^{\circ}$ C 保存。

4. DNA 電泳 :

配製 DNA 電泳膠片 (Agarose gel)，配製方法請參閱附錄四。取 5 或 10 μ l 之 PCR 產物加入 1 或 2 μ l 之 6 \times Loading dye，混合均勻，再將其緩慢注入 DNA 電泳膠片之 Well 中。以 100 伏特強度之電壓進行約 35 分鐘之電泳。最後利用 UV 光進行分析，以確認 PCR 反應所得之產物是否有所表現，及表現情形為何。

(八) DNA fragmentation

將加藥處理後的細胞，除去培養液，以 PBS buffer 洗滌 3 次，加入 1ml 的 PBS buffer 接著將細胞由培養皿刮下來，置於 1.5ml 之離心管 (Eppendorf tube) 中，於 4°C 離心 3000 轉速 10 分鐘，將上澄液移除，接著加入 50 μ l Lysis buffer (1% NP-40、20mM EDTA、50mM Tris-HCl, pH 7.5) 混合均勻，於 4°C 離心 12,000 轉速 10 分鐘，取上澄液至於新的離心管，加入 20% SDS solution 2.5 μ l (最終濃度 1%)，加入 10mg/ml RNase A 25 μ l (最終濃度 5 μ g/ μ l)，56°C 水浴反應 2 小時。在加入 25mg/ μ l Proteinase K 8 μ l (最終濃度 2.5 μ g/ μ l)，37°C 水浴反應 10~12 小時；加入 3M Sodium acetate (pH 5.2) 40 μ l，再加入絕對酒精 300 μ l，於 4°C；12,000 轉速離心 15 分鐘，除去上澄液而剩下 DNA 沈澱物，將 DNA 沈澱物自然乾燥，加入滅菌 ddH₂O 10 μ l (適量) 回溶，利用 1.5% DNA agarose gel，以電壓 50V 跑電泳，用染劑 Gel-STAR 染色，使用數位元影像儀觀看。

(九) 腹動脈結紮手術

先以 Pentobarbital Sodium (0.1 ml / 100g body weight) 將 SD 大白鼠麻醉，將其身體側躺，以膠帶固定四肢，再髖股往上三指處下刀，以棉花棒遊離脂肪，找出腹主動脈，並在兩腎之間的腹主動脈，以棉線打結，接著將傷口縫合，並在傷口上塗上紅藥水。

接著依結紮天數 1、2、3、5、7、10 和 20 天，將以結紮之 SD 大白鼠施以斷頭處理，並快速取出心臟以二次水清洗，並分離出左心室以為實驗的檢體。

結果

圖一、血管昇壓素造成心肌細胞凋亡決定於類胰島素生長因子-II 及 II 接受體之存在。

將心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨使用 10^{-8} M 血壓昇壓素 (Ang II) 或分別加入胰島素生長因數-II 的抗體 (IGF-II Ab)、類胰島素生長因子-II 接受體的抗體 (IGF-II R Ab) 觀察細胞凋亡的情形。由圖一 DNA fragmentation 的結果得知，在加入血壓昇壓素 (Ang II) 的情況下，造成心肌細胞大量凋亡，但若同時處理以類胰島素生長因子-II 的抗體 (IGF-II Ab)、類胰島素生長因子-II 接受體的抗體 (IGF-IIR Ab) 或胰島素生長因數-II anti-sense 時，發現血壓昇壓素 (Ang II) 造成的凋亡情形被完全抑制住了。另外為更進一步瞭解 IGF-II 能否造成心肌細胞的凋亡，將心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨加入 IGF-II (10^{-8} M) 或同時與 IGF-IR Ab 或 IGF-IR Ab + CsA (Calcineurin inhibitor) 一起作用 48 小時，觀察細胞凋亡的情形。而直接加入類胰島素生長因子-II (10^{-8} M) 並不會對心肌細胞造成凋亡，只有在類胰島素生長因子-II (10^{-8} M) 和類胰島素生長因子-I 接受體的抗體 (IGF-IR Ab) 同時存在下時，心肌細胞的凋亡才會發生，且此種因 IGF-II (10^{-8} M) 和類胰島素生長因子-I 接受體的抗體 (IGF-IR Ab) 共同處理下所產生的加乘凋亡現象，並會受到鈣離子的抑制劑 CsA 完全抑制。

圖二、類胰島素生長因子-II antisense 抑制血管昇壓素造成心肌細胞之凋亡。

將心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨使用 10^{-8} M 血壓昇壓素 (Ang II) 並與類胰島素生長因子-II antisense 共同處理，觀察心肌細胞因血壓昇壓素所造成的凋亡現象是否會經由類胰島素生長因子-II antisense 而抑制。由圖二 DNA fragmentation 的結果中得知，由血壓昇壓素所造成的心肌凋亡中，類胰島素生長因子-II 基因的開啟是必須的，因在加入類胰島素生長因子-II antisense 後抑制了血壓昇壓素所造成的心肌凋亡。

圖三、血管昇壓素誘發類胰島素生長因子-II(IGF-II)基因表現所透過之路徑。

由 RT-PCR 的結果得知，在 H9C2 cells 加入血壓昇壓素 (Ang II; 10^{-8} M) 的刺激，能誘發類胰島素生長因子-II(IGF-II)，由圖三中可知，血壓昇壓素 (Ang II) 主要透過 ERK pathway 造成類胰島素生長因子-II(IGF-II) 基因表現量上升。

圖四、血管昇壓素誘發類胰島素生長因子-II 接受體 (IGF-II receptor) 基因表現所透過之路徑。

由 RT-PCR 的結果得知，在 H9C2 cells 加入血壓昇壓素(Ang II; 10^{-8} M) 的刺激，能誘發類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)基因的表達；由圖四中可知，血壓昇壓素(Ang II)是以透過 JNK pathway 造成類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)基因表現量上升。

圖五、使用 DNA 斷裂來探討血管昇壓素造成 H9C2 心肌細胞凋亡透過之路徑。

將 H9C2 心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨使用 10^{-8} M 血壓昇壓素(Angiotensin II; Ang II) 或分別加入六種不同的訊息傳遞路徑的抑制劑共同處理 24 小時，再觀察細胞凋亡的情形；此六種抑制劑中，包括了：SP 600125 (JNK inhibitor)、CsA (Calcineurin inhibitor)、SB203580 (p38 inhibitor)、U0126 (MEK inhibitor)、Stautosprine(PKC inhibitor)、LY294002(PI3K inhibitor)。由圖五 DNA fragmentation 的結果，得知血壓昇壓素(Ang II)主要透過活化 JNK 和 Calcineurin 兩條訊息傳遞路徑造成心肌細胞的凋亡，另外我們亦觀察到在加入 U0126 (MEK inhibitor)時，血壓昇壓素(Ang II)所造成的 DNA fragmentation 有輕微減弱的現象，顯示 MAPK pathway 中的 ERK 亦參與部份的作用，但另一屬於 MAPK pathway 的 p38 和 PKC 並未參與血壓昇壓素

(Ang II) 所造成的心肌細胞凋亡作用中。

圖六、使用凋亡蛋白 Caspase 8 為凋亡指標來探討血管昇壓素造成 H9C2 心肌細胞凋亡透過之路徑。

將 H9C2 心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨使用 10^{-8} M 血壓昇壓素(Angiotensin II; Ang II) 或分別加入六種不同的訊息傳遞路徑的抑制劑共同處理 24 小時，再觀察細胞凋亡的情形；此六種抑制劑中，包括了：SP 600125 (JNK inhibitor)、CsA (Calcineurin inhibitor)、SB203580 (p38 inhibitor)、U0126 (MEK inhibitor)、Stautosprine(PKC inhibitor)、LY294002(PI3K inhibitor)。而在圖六 western blotting 的結果中，得知血壓昇壓素(Ang II)會造成 Caspase 8 的切割活化，而活化的 Caspase 8 會進一步活化下游的 Caspase 3 造成心肌細胞走向凋亡；由圖中，指出血壓昇壓素(Ang II) 是經由 JNK、Calcineurin 和 ERK 三條路徑造成 Caspase 8 的活化。

圖七、使用凋亡蛋白 Caspase 9 為凋亡指標來探討血管昇壓素造成 H9C2 心肌細胞凋亡透過之路徑。

將 H9C2 心肌細胞培養於不含血清的培養液中，單獨使用 10^{-8} M 血壓昇壓素(Angiotensin II; Ang II) 或分別加入六種不同的訊息傳遞路徑的抑制劑共同處理 24 小時，再觀察細胞凋亡的情形；此六種抑制劑

中，包括了：SP 600125 (JNK inhibitor)、CsA (Calcineurin inhibitor)、SB203580 (p38 inhibitor)、U0126 (MEK inhibitor)、Stautosprine(PKC inhibitor)、LY294002(PI3K inhibitor)。在圖七 western blotting 的結果中，亦指出血壓昇壓素(Ang II) 造成 Caspase 9 的切割活化，而 Caspase 9 的活化通常是經由粒線體釋放 cytochrome c 所活化，而活化的 Caspase 9 會進一步切割活化 Caspase 3 造成心肌細胞的凋亡。而由圖中得知血壓昇壓素會經由 JNK、Calcineurin 兩條路徑造成 Caspase 9 的活化。

圖八、藉腹動脈結紮誘發高 Ang II 之 SD 大白鼠，探討其左心室中之類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)蛋白之表達差異

我們將約 6 週齡的 SD 大白鼠施行腹動脈結紮手術，並依結紮天數 0、1、2、3、5、7、10、20 天，斷頭犧牲，取出左心室，萃取左心室中的蛋白質，觀察類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)在蛋白表達上的差異。而施行腹動脈結紮手術會造成的 SD 大白鼠體內血管昇壓素大量上升，我們以此模式來印證在 *in vitro* 時所看到血管昇壓素所造成的心肌凋亡中，類胰

島素生長因子-II 和其接受體參與其中的現象是否相同地存在於高血管昇壓素環境下的動物體內，其左心室內類胰島素生長因子-II 和其接受體的蛋白表現量是否有大量上升，並是否伴隨心肌凋亡的發生。而在圖八 western blotting 的結果中，類胰島素生長因子-II 和類胰島素生長因子-II 接受體的蛋白量在經腹動脈結紮後，左心室內的類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)的蛋白表現量隨著結紮天數的上升而持續增加。同時發現伴隨著 IGF-II 及 IGF-II R 的上升，Caspase 9 的表現量有明顯的上升現象，並隨著結紮天數的增加，在 20 天時，達到最高的表現量。

圖九、藉腹動脈結紮誘發高 Ang II 之 SD 大白鼠，探討其左心室中之類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)基因之表達差異

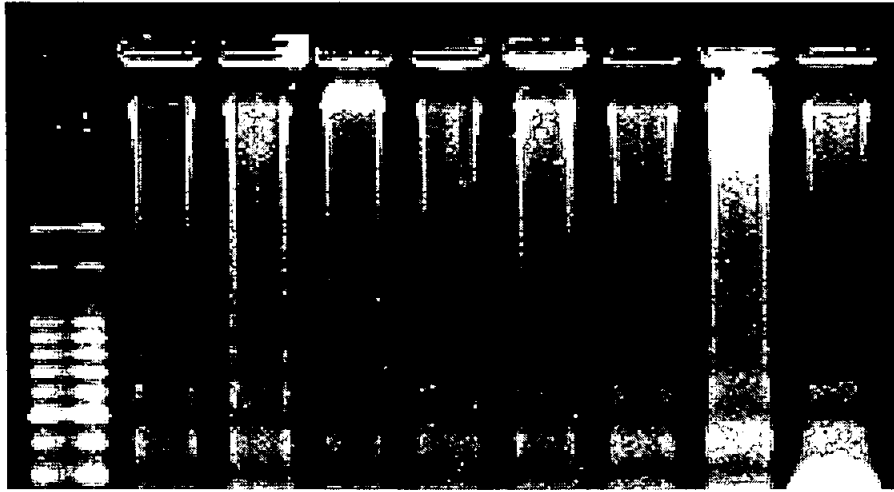
我們將約 6 週齡的 SD 大白鼠施行腹動脈結紮手術，並依結紮天數 0、1、2、3、5、7、10、20 天，斷頭犧牲，取出左心室，萃取左心室的 RNA，觀察類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)在基因表達上的差異；由圖九 RT-PCR 的結果中，指出經腹動脈結紮後，左心室內的類胰島素生長因子-II 和類胰

島素生長因子-II 接受體的基因表現量隨著結紮天數的上升而持續增加；印證在圖八 western blotting 所看到類胰島素生長因子-II 和類胰島素生長因子-II 接受體的蛋白量在經腹動脈結紮後，蛋白表現大量上升的現象。

圖十、類胰島素生長因子-II 接受體參與在類胰島素生長因子-II 與類胰島素生長因子-I 接受體的抗體 (IGF-IR Ab) 共同加乘心肌細胞的過程

由圖一的實驗結果得知，類胰島素生長因子-II 和類胰島素生長因子-I 接受體的抗體共同存在下時，具有加乘誘發心肌細胞凋亡的效果，且此效用需透過 Calcineurin 之訊息傳遞路徑，為證實此一凋亡現象的發生是否為類胰島素生長因子-II 透過位在細胞膜上的類胰島素生長因子-II 接受體所造成，於是進一步將心肌細胞培養於不含血清的培養液中，並單獨加入類胰島素生長因子-II ($10^{-8}M$) 或同時類胰島素生長因子-I 接受體的抗體同時作用，另外在有類胰島素生長因子-II ($10^{-8}M$) 和類胰島素生長因子-I 接受體的抗體共同存在下，再加入類胰島素生長因子-II 接受體；由圖十的結果得知，當同時加入類胰島素生長因子-II ($10^{-8}M$) 和類胰島素生長因子-I 接受體之抗體時，心肌細胞產生加乘性的凋亡，但此凋亡的現象卻在同時加入類胰島

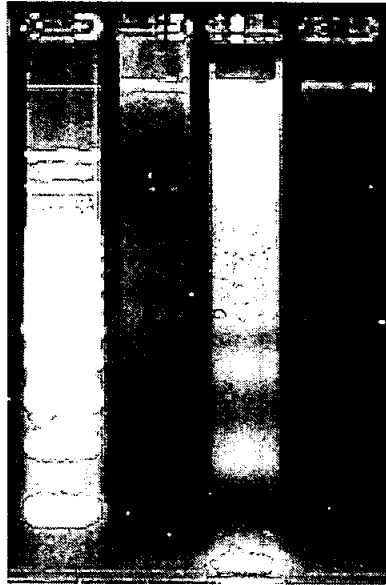
素生長因子-II 接受體時，完全受到了抑制，此實驗結果顯示，當 IGF-I R 阻斷時，類胰島素生長因子-II 透過自己的類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)，活化下游鈣離子訊息途徑，導致心肌細胞凋亡的發生。



Serum free	+	+	+	+	+	+	+	+
Ang II		+	+	+				
IGF-II Ab			+					
IGF-II R Ab				+				
IGF-II					+		+	+
IGF-I R Ab						+	+	+
CsA								+

圖一、血管昇壓素造成 H9C2 心肌細胞的凋亡，決定於類胰島素生長因子-II 及 II 接受體的存在。

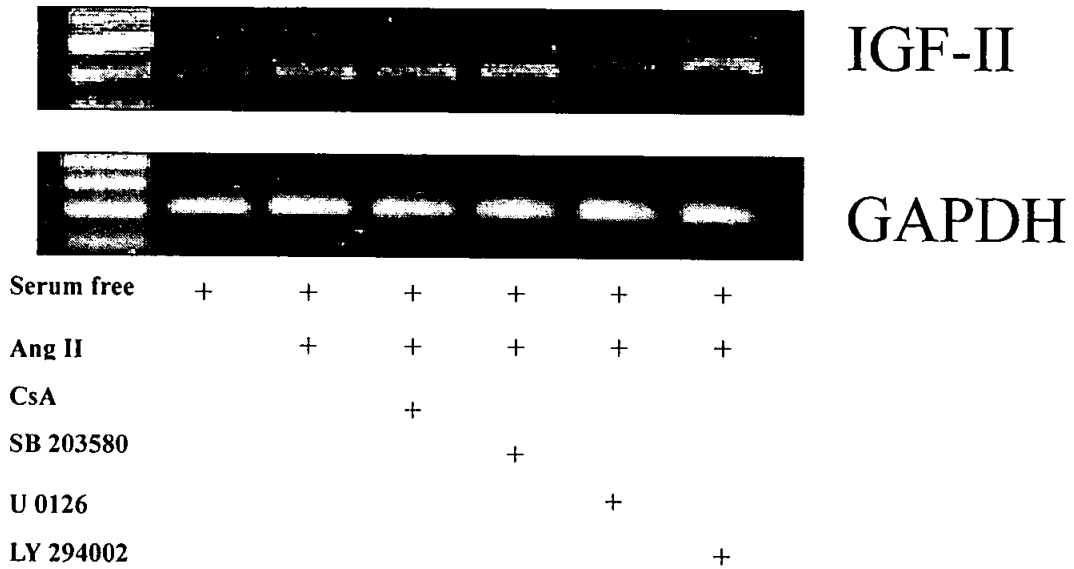
將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時後，加入 IGF-II Ab 和 IGF-IIR Ab 一小時後，加入 AngII(10^{-8} M) 共同處理 48 個小時後，萃取細胞的 DNA 物質，跑 1.5 % 的 agarose gel 的電泳；另外還有單獨加入 IGF-II、IGF-IR Ab、IGF-II+IGF-IRAb 和 IGF-II+IGF-IR Ab + CsA 處理 48 個小時後，萃取細胞的 DNA 物質，跑 1.5 % 的 agarose gel 的電泳。



Serum free	+	+	+
Ang-II		+	+
IGF-II antisense			+

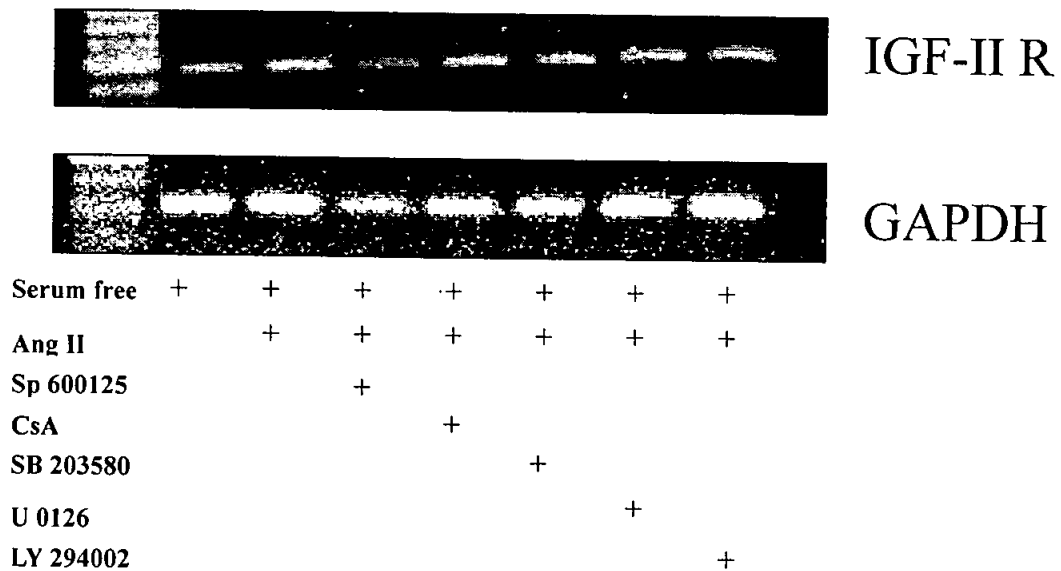
圖二、血管昇壓素造成 H9C2 心肌細胞的凋亡，決定於類胰島素生長因子-II 的存在。

將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時後，加入 IGF-II antisense 一小時後，加入 AngII(10^{-8} M) 共同處理 24 個小時後，萃取細胞的 DNA 物質，跑 1.5 % 的 agarose gel 的電泳。



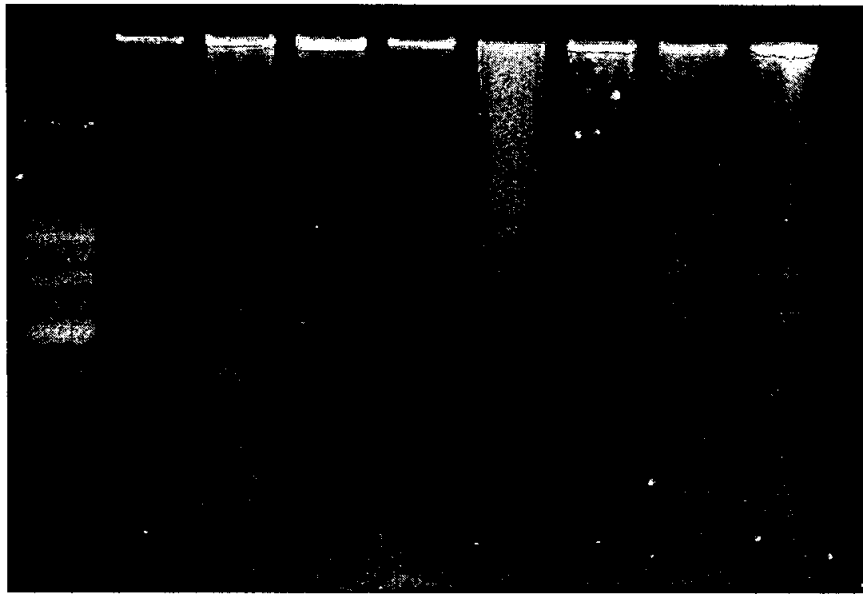
圖三、在 H9C2 心肌細胞中，血管昇壓素誘發類胰島素生長因子-II(IGF-II)基因表達之路徑

將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時，分別加入 CsA、SB600125、U 0126、LY294002 兩小時後，再加入 AngII(10^{-8} M)共同處理 24 個小時，即萃取細胞的 RNA 物質，並依 RT-PCR 測定類胰島素生長因子-II (IGF-II)基因表現量的差異。



圖四、在 H9C2 心肌細胞中，血管昇壓素誘導類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)基因表達之路徑

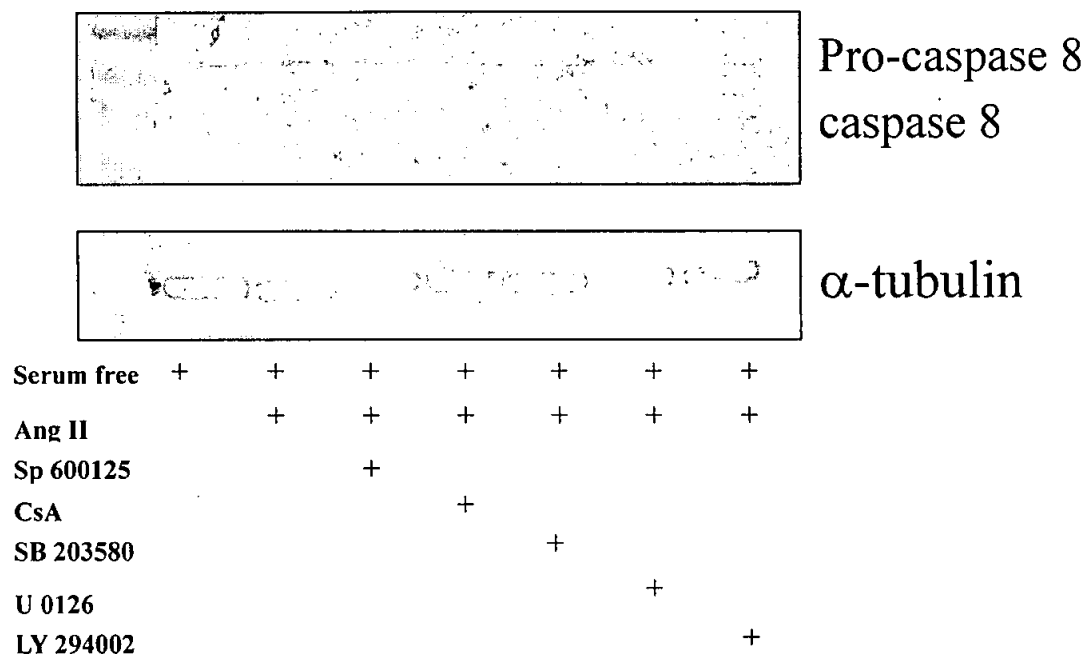
將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時後，分別加入 SP 600125、CsA、SB600125、U 0126、LY294002 兩小時後，再加入 AngII(10^{-8} M)共同處理 24 個小時，即萃取細胞的 RNA 物質，並以 RT-PCR 測定類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)基因表現量的差異。



Serum free	+	+	+	+	+	+	+	+
Ang II		+	+	+	+	+	+	+
Sp 600125			+					
CsA				+				
SB 203580					+			
U 0126						+		
Stautosprine							+	+

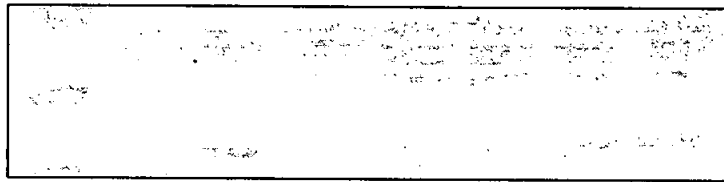
圖五、血管昇壓素誘發 H9C2 心肌細胞產生 DNA 斷裂(DNA fragmentation)產生凋亡，所透過之路徑。

將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時，分別加入 SP 600125 (JNK inhibitor)、CsA (Calcineurin inhibitor)、SB600125 (p38 inhibitor)、U 0126 (MEK inhibitor)、Stautosprine (PKC inhibitor) 兩小時，再加入 AngII(10^{-8} M)共同處理 24 個小時，即萃取細胞的 DNA 物質，置於跑 1.5 %的 agarose gel 中跑電泳。

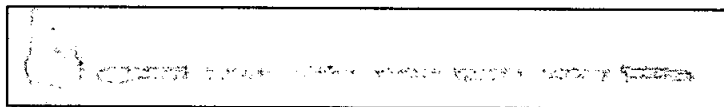


圖六、在 H9C2 心肌細胞中，血管昇壓素活化 Caspase 8 所透過之路徑。

將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時，分別加入 SP 600125、CsA、SB600125、U 0126、LY294002 兩小時，再加入 AngII(10^{-8} M) 共同處理 24 個小時，即萃取細胞的蛋白質，並以西方式點墨法測定 Caspase 8 活化態的含量變化。



Pro-caspase 9
caspase 9

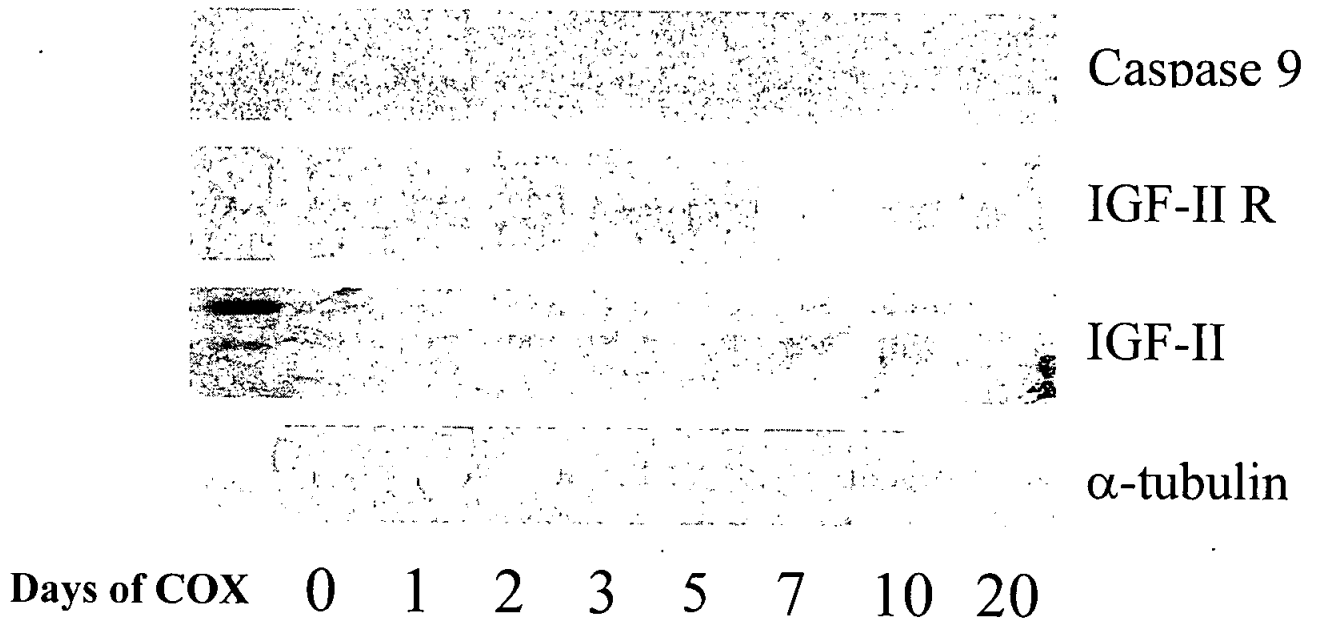


α -tubulin

Serum free	+	+	+	+	+	+	+
Ang II		+	+	+	+	+	+
Sp 600125			+				
CsA				+			
SB 203580					+		
U 0126						+	
LY 294002							+

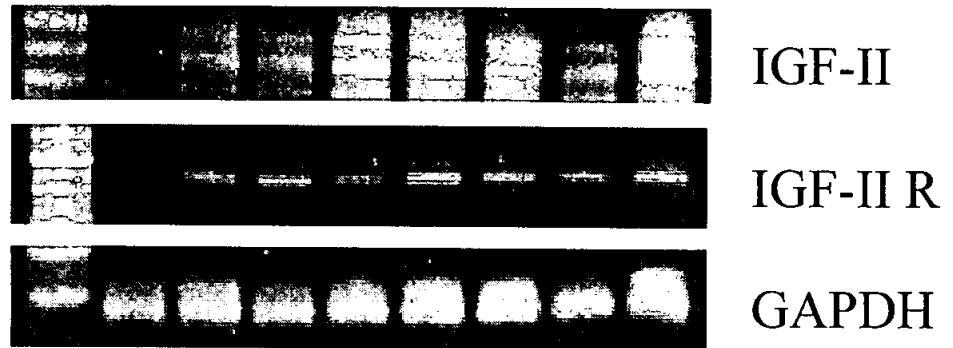
圖七、在 H9C2 心肌細胞中，血管昇壓素活化 Caspase 9 所透過之路徑。

將 H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時，分別加入 SP600125、CsA、SB600125、U 0126、LY294002 兩小時後，再加入 AngII(10^{-8} M) 共同處理 24 個小時後，即萃取細胞的蛋白質，並以西方式點墨法測定 Caspase 9 活化態的含量變化。



圖八、腹動脈結紮誘發高 Ang II 之 SD 大白鼠，其左心室之類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體 (IGF-II receptor)及活化態 Caspase 9 的蛋白表現

將 SD 大白鼠處以腹動脈結紮，依結紮天數 0、1、2、3、5、7、10、20 天，依序犧牲，萃取左心室之蛋白質，以西方點墨法測定類胰島素生長因子-II(IGF-II)、類胰島素生長因子接受體(IGF-II receptor)及活化態 Caspase9 蛋白含量差異。



Days of COX 0 1 2 3 5 7 10 20

圖九、腹動脈結紮誘發高 Ang II 之 SD 大白鼠，其左心室之類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體 (IGF-II receptor)基因表現之探討

將 SD 大白鼠處理以腹動脈結紮，依結紮天數 0、1、2、3、5、7、10、20 天，依序犧牲，並萃取左心室之 RNA 物質，以 RT-PCR 測定類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子接受體(IGF-II receptor)基因表現量之差異。



Serum free	+	+	+	+
IGF-II		+	+	+
IGF-I R Ab			+	+
IGF-II Ab				+

圖十、在 H9C2 cells 中，類胰島素生長因子-II 與類胰島素生長因子-I 接受體的抗體 (IGF-IR Ab) 協同造成凋亡的機制中與類胰島素生長因子-II 接受體之相關性

H9C2 cells 先行處理 serum free 12 個小時後，單獨加入 IGF-IR Ab 或與 IGF-IIR Ab 一同加入，作用一小時後，加入 IGF-II ($10^{-8}M$) 共同處理 48 個小時後，萃取細胞的 DNA 物質，跑 1.5 % 的 agarose gel 的電泳。

實驗討論

在圖一 DNA fragmentation 的結果得知，在 Angiotensin II (Ang II) 導致心肌細胞凋亡中，Insulin-like growth factors II (IGF- II) 和 IGF-II receptor 參與其中，但 IGF- II 被認為與 IGF-I 相同為一 survival factor，主要是透過 IGF-I receptor 造成細胞生長。而當 IGF- II 結合於 IGF-II receptor 時，IGF-II receptor 與 Gai-2 行偶合作用，抑制 cAMP 和增加細胞內 Ca^{2+} influx，而大量的 Ca^{2+} 被證實能活化 Calcineurin-NFAT signaling pathway，但並未有文獻指出 IGF- II 能經由 Calcineurin-NFAT signaling pathway 導致心肌細胞的凋亡，而在圖一中證實了單獨存在的 IGF- II 是無法導致心肌細胞凋亡，但若有 IGF-I receptor antibody 存在下，加入 IGF- II 便會導致心肌細胞嚴重凋亡，而加入 IGF-I receptor antibody 的目的，在於確定 IGF-II 是經由 IGF-II receptor pathway。而在由 IGF- II 和 IGF-I receptor antibody 導致心肌細胞凋亡中，加入 Calcineurin (cyclosporine A; CsA) 的抑制劑後，凋亡的現象便被完全抑制。由此實驗結果顯示 IGF- II 和 IGF-II receptor 參與在 Ang II 導致心肌細胞凋亡的路徑中，且單獨存在的 IGF- II 必須在有 IGF-I receptor antibody 的情況下，才會透過影響鈣離子，進而活化 Calcineurin 導致心肌細胞凋亡。

Ang II 並未被證實能夠增加 IGF- II 或 IGF-II receptor 的基因表

現量，但在圖一中，卻證實 IGF-II 和 IGF-II receptor 參與在 Angiotensin II (Ang II) 導致心肌細胞凋亡的路徑中，所以我們使用了五種不同訊息傳遞的抑制劑，想要出 Ang II 是否能增加 IGF-II 或其接受體的基因表現量，以及是透過什麼路徑所造成？由圖二 RT-PCR 的結果得知，Ang II 確實能增加 IGF-II 或 IGF-II receptor 的基因表現量，並指出，Ang II 是透過 ERK 來增加 IGF-II 的基因表現量以及透過 JNK 來增加 IGF-II receptor 的基因表現量。

而先前的文獻指出，Ang II 主要透過 JNK、ERK 和 Calcineurin 三條路徑來造成 cardiac hypertrophy，但相對於 Hypertrophy，Ang II 導致心肌細胞凋亡的路徑並未被深入探討，在圖三 (A) DNA fragmentation 的實驗結果中，指出 Ang II 主要透過 JNK 和 Calcineurin 兩條路徑導致心肌細胞凋亡；但在加入 U0126 (MEK inhibitor) 後，DNA fragmentation 的現象有減弱的情形，顯示 Ang II 經 ERK 所造成心肌細胞的凋亡為次要的路徑。而圖三 (B、C) western blotting 的實驗中，測定了 pro-apoptotic protein (Caspase 8 和 Caspase 9) 活化態的表現量，由實驗結果中得知，Ang II 均能活化 Caspase 8 和 Caspase 9，且是透過 JNK、Calcineurin 和 ERK 這三條路徑，此一實驗結果與圖三 (A) DNA fragmentation 的結果相同。

最後，我們以腹動脈結紮誘發高 Ang II 的 SD 大白鼠為實驗模

式，探討在其左心室肥大過程中，是否伴隨著 IGF-II 和 IGF-II receptor 的表現增加，在圖四 (A、B) western blotting 和 RT-PCR 的結果中，指出經腹動脈結紮後，左心室內的類胰島素生長因子-II(IGF-II)和類胰島素生長因子-II 接受體(IGF-II receptor)的基因表現量和蛋白表現量，隨著結紮天數的上升而持續增加，同時發現伴隨著 IGF-II 及 IGF-IIR 的上升，活化態的 Caspase 9 的表現量有明顯的上升現象，並隨著結紮天數的增加，在 20 天時，達到最高的表現量。顯示在 *in vivo* 的環境下，當心臟受外力刺激下誘發病理性肥大時，IGF-II 及 IGF-IIR 的表現量均有增加的情形，且伴隨著增加 pro-apoptotic protein (活化態 Caspase 9) 的表現量。而在圖四 (C) 中，證實了在由 IGF-II 和 IGF-I receptor antibody 導致心肌細胞凋亡中，若同時加入 IGF-II receptor antibody，則凋亡的現象就被抑制住了，顯示 IGF-II 是經由 IGF-IIR 造成心肌細胞的凋亡。

綜合上述，我們發現了 Ang II 透過 JNK、Calcineurin 和 ERK 導致心肌細胞凋亡；且 IGF-II 和 IGF-II receptor 參與在 Ang II 導致心肌細胞凋亡的路徑中，並發現 Ang II 是透過 ERK 來增加 IGF-II 的基因表現量以及透過 JNK 來增加 IGF-II receptor 的基因表現量。並指出 IGF-II 必須在 IGF-I receptor 產生阻抗的情況下，經由 IGF-II receptor 活化 Calcineurin 造成心肌細胞的凋亡。顯示在 Ang II 導致心肌細胞凋

亡的途徑中，IGF-II 經 IGF-II receptor 所活化的路徑為一決定性的角色。

參考文獻：

1. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler R, Saye J and Smith R. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.
Pharmacol. Rev., 1993; 45: 205–251.
2. Dostal DE and Baker KM. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: Mediation by the AT1 receptor.
Am. J. Hypertens., 1992; 5: 276–280.
3. Mohammad Amin Zaman, Suzanne Oparil and David A. Calhoun. DRUGS TARGETING THE RENIN–ANGIOTENSIN–ALDOSTERONE SYSTEM.
NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 2002; 1: 621-636.
4. Conrad Sernia. A Critical Appraisal of the Intrinsic Pancreatic Angiotensin -Generating System.
JOP. J. Pancreas., 2001; 2: 50-55.
5. Lijnen P. and Petrov V. Renin-Angiotensin System, Hypertrophy and Gene Expression in Cardiac Myocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1999; 31: 949-970.
6. Walmor C. De Mello, A.H. Jân Danser. Angiotensin II and the Heart On the Intracrine Renin-Angiotensin System.
Hypertension. 2000; 35: 1183-1188.
7. Baker KM, Campanile MP, Trachte GJ, Peach MJ. Identification and characterization of the rabbit angiotensin II myocardial receptor.
Circ. Res., 1984; 54: 286 –293.
8. Rioux F, Park WF, Regoli D. Characterization of angiotensin receptors in rabbit isolated atria.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 1975; 54: 229 –237.
9. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans P. Identification of angiotensin II receptor subtypes.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 165: 196–203.
10. Hein L. Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors.
J. Mol. Med., 1998; 76: 756–763.
 11. Sasaki K, Yamano Y, Bardham S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor.
Nature, 1991; 351: 230–233.
 12. Clauser E. Molecular structure and function of angiotensin II receptors.
Nephrologie., 1998; 19: 403–410.
 13. Inagami T, Guo DF, Kitami Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview.
J. Hypertens., 1994; 12: S83–S94.
 14. Dzau VJ, Mukoyama M, Pratt RE. Molecular biology of angiotensin II receptors: target for drug research?
J. Hypertens., 1994;12: S1–S5.
 15. Samyn ME, Petershak JA, Bedell KA, Mathews MS, Segar JL. Ontogeny and regulation of cardiac angiotensin type 1 and 2 receptors during fetal life in sheep.
Pediat.r Res., 1998; 44: 323–329.
 16. Price RL, Carver W, Simpson DG, Fu L, ZhaoJ, Borg TK, Terracio L. The effects of angiotensin II and specific angiotensin receptors blockers on embryonic cardiac development and looping patterns.
Dev. Biol., 1997; 192:572–584.
 17. Shibasaki Y, Nishiue T, Masaki H, Matsubara H, Iwasaka T. Angiotensin II type 1 antagonist suppress left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in patient with end stage renal disease (ESRD).
Nippon. Rinsho., 2002; 60: 1992-8.
 18. Anderson KM, Murahashi T, Dostal DE, Peach MJ. Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic

- smooth muscle cells.
Am. J. Physiol., 1993; 264: C179–C188.
19. Fu ML, Schulze W, Wallukat G, Elies R, Eftekhari P, Hjalmarson A, Hoebeke J. Immunochemical localization of angiotensin II receptor (AT1) in the heart with anti-peptide antibodies showing a chronotropic effect.
Receptors Channels, 1998; 6: 99–111.
20. Re RN, Vizard DL, Brown J, LeGros L, Bryan SE. Angiotensin II receptor in chromatin.
J. Hypertens., 1984; 2: S271–S173.
21. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.
Blood Press., 2003; 12: 70–88.
22. Thomas WG, Thekkumbara TJ, Baker KM. Cardiac effects of angiotensin II AT1 receptor signaling, desensitization and internalization.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996; 396: 59–69.
23. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Lorrel BH. Angiotensin II type-2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied rats.
Circulation, 1999; 99: 22–25.
24. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases.
Circ. Res., 1998; 83: 1182–1192.
25. Wharton J, Morgan K, Rutherford RAD, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, De Leval MR, Jacoub MH, Pollack JM. Differential distribution of AT2 receptors in the normal and failing human heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998; 284: 323–336.
26. Brink M, Erne P, de Gasparo M, Rogg H, Schmid A, Stulz P, Bullock G. Localization of the angiotensin II receptor subtypes in the human atrium.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1996; 28: 1789–1799.

27. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997; 29: 859–870.
28. Lehtonen JA, Horiuchi M, Dzau VJ. Ceramide as a second messenger for angiotensin II type 2 receptor–mediated apoptosis. *Circulation*, 1997; 96: 548-554.
29. Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II type-1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation*, 1999; 100: 2093–2999.
30. Tamura M, Wanaka Y, Landon EJ, Inagami T. Intracellular sodium modulates the expression of angiotensin II subtype 2 receptor in PC12W cells. *Hypertension*, 1999; 33: 626–632.
31. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BLM, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II-type 2 receptor. *Nature*, 1995; 377: 748 –750.
32. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomoto N, Nozawa Y, Mori Kurihara T, Yamaki A, Inomoto N, Nozawa Y, Mori Y, et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 527–535.
33. Osterop APRM, Kofflard MJM, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MADH, Danser AHJ. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*, 1998; 32: 825– 830.
34. Schmieder RE, Erdmann J, John S, Delles C, Jacobi J, Fleck E, Hilgers K, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II type 2 receptor gene variant modifies left ventricular structure in humans. *Circulation*, 1999; 100; 746 -754.

35. Sadoshima J and Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.
Annu. Rev. Physiol., 1997; 59: 551–571.
36. Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC and Marsh JD. Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide.
Am. Physiol., 1998; 275: H1370–H1374.
37. Sadoshima J and Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: Critical role of the AT1 receptor subtype.
Circ. Res., 1993; 73: 413–423.
38. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP and Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes: The critical role of Ca²⁺-dependent signaling.
Circ. Res., 1995; 76: 1–15.
39. Kodama H, Fukuda K, Pan J, Makino S, Sano M, Takahashi T, Hori S and Ogawa S. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes.
Circ. Res., 1998; 82: 244–250.
40. Aoki H, Izumo S and Sadoshima J. Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: A critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation.
Circ. Res., 1998; 82: 666–676.
41. Takano H, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Yamazaki T and Yazaki Y. Activation of p70 S6 protein kinase is necessary for angiotensin II-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes.
FEBS Lett., 1996; 379: 255–259.
42. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T and Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II.

Circulation, 1998; 98: 794–799.

43. Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F and Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes.
J. Clin. Invest., 1993; 92: 398–403.
44. Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G and Lorell BH. Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts: Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II.
Circ. Res., 1995; 76: 489–497
45. Dostal DE, Booz GW and Baker KM. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: Conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function.
Mol. Cell. Biochem., 1996; 157: 15–21.
46. Crabos M, Roth M, Hahn AW and Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts: Coupling to signaling systems and gene expression.
J. Clin. Invest., 1994; 93: 2372–2378.
47. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC and Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts.
Circ. Res., 1993; 72: 1245–1254.
48. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL and Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction.
J. Clin. Invest., 1996; 98: 2218–2227.
49. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Aikawa R, Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Tobe K, Kadowaki T and Yazaki Y. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: Critical roles of G-beta-gamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts.
Circ. Res., 1998; 82: 337–345.

50. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS and Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II.
Circ. Res., 1991; 69: 1185–1195.
51. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K and Iwao H. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats.
Hypertension, 1995; 25:1252–1259.
52. Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV and Kyriakis JM. Stress activated protein kinases in cardiovascular disease.
Circ. Res., 1996; 78: 947–953.
53. Sugden PH and Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy.
J. Mol. Med., 1998; 76: 725–746.
54. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC and Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1994; 26:279–292.
55. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.
J. Biol. Chem., 1995; 270:16483–16486.
56. Kim SJ, Glick A, Sporn MB and Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β 1 gene.
J. Biol. Chem., 1989; 264: 402–408.
57. Bishopric NH, Jayasena V and Webster KA Positive regulation of the skeletal α -actin gene by fos and jun in cardiac myocytes.
J. Biol. Chem., 1992; 267: 25535–25540.
58. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M and Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor- β 1 is mediated by the AP-complex.
Mol. Cell. Biol., 1990; 10: 1492–1497.
59. Jeffery D, Molkenin, Jian-Rong Lu, Christopher L. Antos, Bruce Markham, James Richardson, Jeffrey Robbins, Stephen R. Grant, and Eric N. Olson. A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy.

- Cell*, 1998; 93: 215-228.
60. Rump LC, Schwertfeger E, Schaible U, Fraedrich G and Schollmeyer P Beta 2-adrenergic receptor and angiotensin II receptor modulation of sympathetic neurotransmission in human atria.
Circ. Res., 1994; 74: 434-440.
61. Henegar JR, Schwartz DD and Janicki JS Ang II-related myocardial damage: role of cardiac sympathetic catecholamines and beta-receptor regulation.
Am. J. Physiol., 1998; 275: H534-H541.
62. Morgan HE, Baker KM. Cardiac hypertrophy.
Circulation, 1991; 83: 13-25.
63. Sheetz MP, Dai J. Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension.
Trends Cell Biol., 1996; 6: 85-89
64. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro.
Cell, 1993; 75: 977-84.
65. 4. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system.
Annu. Rev. Physiol., 1992; 54: 227-41.
66. Kernan M, Zuker C. Genetic approaches to mechanosensory transduction.
Curr. Opin. Neurobiol., 1995; 5: 443-48.
67. Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/ paracrine mechanism.
EMBO J. 1993; 12: 1681-92.
68. Rozengurt E. Neuropeptides as cellular growth factors: role of multiple signaling pathways.
Eur. J. Clin. Invest., 1991; 21: 123-134.

69. Vandeburgh HH. Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro.
Am. J. Physiol., 1992; 262: R350-55.
70. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, et al. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy.
Circ. Res., 1995; 77: 258-65.
71. Junichi Sadoshima and Seigo Izumo. THE CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSE OF CARDIAC MYOCYTES TO MECHANICAL STRESS.
Annu. Rev. Physiol., 1997. 59: 551-71.
72. Stewart C. E. and Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors.
Physiol. Rev., 1996; 76: 1005-1026.
73. JOHN I. JONES AND DAVID R. CLEMMONS. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions.
Endocrine Review, 1995; 16: 3-35.
74. Rinderknecht E. and Humbel R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin.
J. Biol. Chem., 1978; 253: 2769 - 2776.
75. RINDERKNECHT, E., AND HUMBEL R. E. Primary structure of human insulin-like growth factor II.
FEBS Lett., 1978; 89: 283-286.
76. BAXTER, R. C. Circulating binding proteins for the insulinlike growth factors.
Trends Endocrinol Metab., 1993; 4: 91-96.
77. BACH, L. A., AND M. M. RECHLER. Insulin-like growth factor binding proteins.
Diabetes Rev., 1995; 3: 38-61.
78. A Ullrich, A Gray, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, and Chen E. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants

that define functional specificity.
EMBO J., 1986; 5: 2503-2512.

79. Jones JI and Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions.
Endocr. Rev., 1995; 16: 3-34.
80. Gustafson TA and Rutter WJ. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. Evidence from receptor chimeras.
J. Biol. Chem., 1990; 265: 18663 - 18667.
81. Flier JS, Usher P, Moses AC. Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor block IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-1 and insulin in human skin fibroblasts.
PNAS. 1986: 7283-7288.
82. LEROITH, D., H., WERNER, D. BEITNER-JOHNSON, AND C. T. ROBERTS, JR. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.
Endocr. Rev., 1995; 16: 143-163.
83. WERNER, H., AND D. LEROITH. Insulin-like growth factor I receptor: structure, signal transduction, and function.
Diabetes Rev., 1995; 3: 28-37.
84. Hsu D, Knudson PE, Zapf A, Rolband GC, and Olefsky JM. NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling.
Endocrinology, 1994; 134: 744-750.
85. MYERS, M. G. , JR., X. J. SUN, AND M. F. WHITE. The IRS-1 signaling system.
Trends Biochem Sci., 1994; 19: 289-294.
86. KAPPELLER, R., AND L. C. CANTLEY. Phosphatidylinositol 3-kinase.
Bioessays, 1994; 16: 565-576.

87. Lynn B., Reichart Donna R., Staubs Patricia A., Jhun Byung H., Hsu David, Maegawa Hiroshi, Milarski Kim L., Saltiel Alan R., and Olefsky Jerrold M.. Localization of the Insulin-like Growth Factor I Receptor Binding Sites for the SH2 Domain Proteins p85, Syp, and GTPase Activating Protein. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 19151-19157.
88. Blakesley VA, Kalebic T, Helman LJ, Stannard B, Faria TN, Roberts Jr CT and LeRoith D. Tumorigenic and mitogenic capacities are reduced in transfected fibroblasts expressing mutant insulin-like growth factor (IGF)-I receptors. The role of tyrosine residues 1250, 1251, and 1316 in the carboxy-terminus of the IGF-I receptor. *Endocrinology*, 1996; 37: 410-417.
89. Yamamoto K, Altschuler D, Wood E, Hoelick K, Jacobs S, Lapetina EG. Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH2 domains of phosphatidyl-inositol 3-kinase p85. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 11337 –11343.
90. KORNFIELD, S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 1992; 61: 307-330.
91. MORGAN, D. O., EDMAN J. C., STANDRING D. N., FRIED V. A., SMITH M. C., ROTH R. A., AND RUTTER W. J. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature Lond.*, 1987; 329: 301-307.
92. Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, and Sly WS. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 2553-2562.
93. LAUREYS, G., BARTON D. E., ULLRICH A., AND FRANCKE U. Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics*, 1988; 3:224-229.

94. SZEKENYI, G., AND ROTWIN P.. The mouse insulin-like growth factor II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor gene: molecular cloning and genomic organization.
Genomics., 1994; 19: 120-129.
95. Westlund B, Dahms NM, and Kornfeld S. The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7- 11 of the extracytoplasmic region.
J. Biol. Chem., 1991; 266: 23233-23239.
96. Dahms NM, Wick DA, and Brzycki-Wes sell MA. The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of the insulin-like growth factor II binding site to domains 5-11.
J. Biol. Chem., 1994; 269: 3802 – 3809.
97. Clairmont KB and Czech MP. Extracellular release as the major degradative pathway of the insulin- like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor.
J. Biol. Chem., 1991; 266: 12131 - 12134.
98. Braulke T, Causin C, Waheed A, Junghans U, Hasilik A, Maly P, Humbel RE, von Figura K. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor: distinct binding sites for mannose 6-phosphate and insulin-like growth factor II.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988; 150: 1287-1293.
99. Tsuneya Ikezu, Takashi Okamoto, Ugo Giambarella, Takashi Yokota, and Ikuo Nishimoto. *In Vivo* Coupling of Insulin-like Growth Factor II/Mannose 6-Phosphate Receptor to Heteromeric G Proteins.
J. Biol. Chem., 1995; 270: 29224-29228.
100. Nishimoto I, Hata Y, Ogata E, and Kojima I. Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c 3T3 cells primed with epidermal growth factor. Characteristics of calcium influx and involvement of GTP-binding protein.
J. Biol. Chem., 1987; 262: 12120-12126.
101. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.

Endocr. Rev., 1995; 16: 143–63.

102. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptors.

Annu. Rev. Biochem., 1992; 61: 307–30.

103. Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gaudie, J., and Bleackley, R. C. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis.

Cell, 2000; 103, 491–500.

104. Frédéric Blanchard, Laurence Duplomb, Sylvie Raheer, Patricia Vusio, Bernard Hoflack, Yannick Jacques, and Anne Godard. Mannose 6 –Phosphate /Insulin-like Growth Factor II Receptor Mediates Internalization and Degradation of Leukemia Inhibitory Factor but Not Signal Transduction.

J. Biol. Chem., 1999; 274: 24685-24693.

105. Jing X. Kang, Yunyuan Li, and Alexander Leaf. Mannose-6-phosphate /insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1997; 94: 13671-13676.

106. Anders Nykjær, Erik I. Christensen, Henrik Vorum, Henrik Hager, Claus M. Petersen, Hans Roigaard, Hye Y. Min, Frederik Vilhardt, Lisbeth B. Moller, Stuart Kornfeld, and Jorgen Gliemann. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor-II Receptor Targets the Urokinase Receptor to Lysosomes via a Novel Binding Interaction.

J. Cell Biol., 1998; 141: 815-828.

107. Dennis PA and Rifkin DB. Cellular Activation of Latent Transforming Growth Factor β Requires Binding to the Cation-Independent Mannose 6-Phosphate /Insulin-Like Growth Factor Type II Receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991; 88,: 580-584.

108. Lamm GM, Christofori G. Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumor cells.

Cancer Res., 1998; 58: 801–807.

109. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: A review.
Horm. Res., 1994; 42: 140–144.
110. O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y *et al.* Identification domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis.
Mol. Cell. Biol., 1997; 17: 427–435.
111. Kauffman-Zeh A, Rodriguez Viciano P, Ulrichy E *et al.* Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB.
Nature, 1997; 385: 544–548.
112. Suzuki J, Kaziro Y, Koide H. Synergistic action of R-Ras and IGF-I on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-I control distinct anti-apoptotic kinase pathways.
FEBS Lett., 1998; 437: 112–116.
113. Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product.
Endocrinology, 1997; 138: 1355–8.
114. Toms SA, Hercbergs A, Liu J *et al.* Antagonist effect of insulinlike growth factor I on protein kinase-mediated apoptosis in human glioblastoma cells in association with bcl-2 and bcl-xL.
J. Neurosurg., 1998; 88: 884–9.
115. Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld RG. Transforming growth factor-beta-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factorbinding protein-3 action.
J. Biol. Chem., 1995; 270: 13 589–13592.
116. Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid- and transforming growth factor b2-induced growth inhibition in human breast cancer cells.
Cancer Res., 1996; 56: 1545–1550.

117. Rozen F, Zhang J, Pollak M. Antiproliferative action of tumor necrosis factor- α on MCF-7 breast cancer cells is associated with increased insulin-like growth factor binding protein-3 accumulation.
Int. J. Oncol., 1998; 13: 865–869.
118. Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells.
J. Biol. Chem., 1996; 271: 1016–1021.
119. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism.
J. Biol. Chem., 1997; 272: 12 181–188.
120. Shen L, Glazer RI. Induction of apoptosis in glioblastoma cells by inhibition of protein kinase C and its association with the rapid accumulation of p53 and induction of the insulin-like growth factor-1 binding protein 3.
Biochem. Pharm., 1998; 55: 1711–1719.
121. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes.
Circulation, 1993; 87:1715-1722.
122. Carmen E. Perrone, Daniela Fenwick-Smith, and Herman H. Vandeburgh. Collagen and Stretch Modulate Autocrine Secretion of Insulin-like Growth Factor-1 and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins from Differentiated Skeletal Muscle Cells.
J. Biol. Chem., 1995; 270: 2099 - 2106.
123. Susumu Adachi, Hiroshi Ito, Hajime Akimoto, Masato Tanaka, Hiroyuki Fujisaki, Fumiaki Marumo and Michiaki Hiroe. Insulin-like Growth Factor-II Induces Hypertrophy with Increased Expression of Muscle Specific Genes in Cultured Rat Cardiomyocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1994; 26:789-1008.

124. Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1996; 93: 8630–8635.
125. Marcelina Párrizas, Alan R. Saltiel, and Derek LeRoith. Insulin-like Growth Factor 1 Inhibits Apoptosis Using the Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways
J. Biol. Chem., 1997; 272: 154 - 161.
126. Huang Chih-Yang, Hao Ling-Yang and Buetow Dennis E.. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-II INDUCES HYPERTROPHY OF ADULT CARDIOMYOCYTES VIA TWO ALTERNATIVE PATHWAYS.
Cell Biol. Int., 2002; 26: 0737-0739.
127. Huang CY, Hao LY, Buetow DE. Insulin-like growth factor-induced hypertrophy of cultured adult rat cardiomyocytes is L-type calcium-channel-dependent.
Mol. Cell. Biochem., 2002; 231: 51-59.
128. Su EJ, Cioffi CL, Stefansson S, Mittereder N, Garay M, Hreniuk D, Liao G. Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2003; 284: H1429-1440.
129. HUNTER JOHN J., AND CHIEN KENNETH R.. SIGNALING PATHWAYS FOR CARDIAC HYPERTROPHY AND FAILURE.
The New England Journal of Medicine, 1999; 341: 1276-1283.
130. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart.
The New England Journal of Medicine, 1997;336: 1131–1141.
131. Jeffery D Molkentin and GeraldWDorn II. CYTOPLASMIC SIGNALING PATHWAYS THAT REGULATE CARDIAC HYPERTROPHY.
Annu. Rev. Physiol. 2001;.63:391–426.

132. Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 1994; 369: 418–20.
133. Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ. A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 14251–54.
134. Böhm M, Kirchmayr R, Erdmann E. Myocardial Gi alpha-protein levels in patients with hypertensive cardiac hypertrophy, ischemic heart disease and cardiogenic shock. *Cardiovasc. Res.*, 1995; 30 : 611–18.
135. Geng YJ, Ishikawa Y, Vatner DE, Wagner TE, Bishop SP, et al. Apoptosis of cardiac myocytes in Gs_α transgenic mice. *Circ. Res.*, 1999; 84: 34–42.
136. Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ. Transient cardiac expression of constitutively active G_q leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 13893–98.
137. Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 23173–78.
138. Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*, 1996; 78: 954–61.
139. Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J. Cell. Biol.*, 1997; 139: 115–127

140. Choukroun G, Hajjar R, Fry S, del Monte F, Haq S, et al. Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH2-terminal kinases.
J. Clin. Invest., 1999; 104: 391–398
141. Dorn GW 2nd, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinaseCtranslocation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 96: 12798–12803.
142. Luo Z, Shyu KG, Gualberto A, Walsh K. Calcineurin and cardiac hypertrophy.
Nat. Med., 1998; 10: 1092–1093.
143. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress.
Cell, 1999; 97: 189–198.
144. Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease.
J. Mol. Cell. Cardiol., 1999; 31:2049–2061.
145. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke “fetal” contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes.
J. Clin. Invest., 1990; 85:507–514.
146. Solange Desagher and Jean-Claude Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis.
CELL BIOLOGY, 2000; 10: 369-377.
147. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.
The New England Journal of Medicine, 1996; 335:1182–1189.
148. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa. Apoptosis in the failing

human heart.

The New England Journal of Medicine, 1997; 336: 1131–1141.

149. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia.

The New England Journal of Medicine, 1996; 335:1190–1196.

150. Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P.

Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart.

J. Mol. Cell. Cardiol., 1996; 28: 2005–2016.

151. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis.

Circulation, 1995; 91: 2703–2711.

152. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias.

Circulation, 1994; 90: 556–573.

153. James TN, St. Martin E, Willis PW III, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways.

Circulation, 1996; 93: 1424–1438.

154. Armin Haunstetter, Seigo Izumo. Apoptosis Basic Mechanisms and Implications for Cardiovascular Disease.

Circ. Res., 1998; 82: 1111-1129.

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院)
系所

組 九十一 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：_____

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：黃志揚

研究生簽名：朱俊憲
(親筆正楷)

學號：9009001
(務必填寫)

日期：民國 年 月 日
